

**Strukturuntersuchungen an der $\alpha 2$ -Kette
und Charakterisierung von
Quervernetzungscomponenten im löslichen
Kollagen aus Kalbshaut**

Dirk Breitkreutz

1973
-



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548326_0036

Strukturuntersuchungen an der $\alpha 2$ -Kette und
Charakterisierung von Quervernetzungs-kompo-
nenten im löslichen Kollagen aus Kalbshaut

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München



Vorgelegt von
Dirk Breitzkreutz

München 1973



1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Kühn
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Severin

Tag der mündlichen Prüfung: 24.7.1973

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Kühn durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. K. Kühn danke ich für die wohlwollende Unterstützung und Förderung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Th. Severin danke ich für sein Interesse.

Herrn Dr. P. Fietzek gilt mein besonderer Dank für die Einweisung in die Methodik der Kollagenchemie, Betreuung der Arbeit und anregende Diskussionen.

Herzlich möchte ich allen Mitarbeitern des Arbeitskreises für Ratschläge und ständige Hilfsbereitschaft danken.

INHALT

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Aufgabenstellung	7
1.2. Abkürzungen	9
2. ERGEBNISSE	
2.1. Präparation von löslichen Komponenten	
2.1.1. Natives Kollagen	10
2.1.2. Denaturierende Extraktion	14
2.1.3. Isolierung der $\alpha 2$ -Kette	14
2.2. Abspaltung nichthelikaler Bereiche vom nativen Molekül	
Isolierung verkürzter $\alpha 2$ -Ketten	
2.2.1. Proteolytischer Abbau	17
2.2.2. Limitierter Bromcyanabbau	20
2.2.3. Vergleich der verkürzten Ketten	25
2.2.4. Abgespaltene Peptide	27
2.3. Untersuchung des N-terminalen Bereichs der $\alpha 2$ -Kette	
2.3.1. Bromcyanpeptide am Aminoende	29
2.3.2. Sequenzierung	35
2.3.3. Diskussion	37
2.4. N-terminale Quervernetzung	38
2.4.1. Peptid der $\beta 12$ -Komponente	39
2.4.2. Peptid der $\beta 11$ -Komponente	45
2.4.3. Diskussion	47
2.5. Quervernetzung über C-terminale Peptide	48
2.5.1. Komponenten aus SLK-Extrakten	49
2.5.2. Untersuchung der $\beta 12$ -Fraktion	52
2.5.3. Nachspaltung der Komponenten vom limitierten Bromcyanabbau	54
2.5.4. Diskussion	57

		Seite
2.6.	Fragmentierung des nativen Moleküls mit Kollagenase	59
2.6.1.	Abbau und fraktionierte Fällung	61
2.6.2.	Separierung der $\alpha 1$ -und $\alpha 2$ -Bruchstücke	62
2.6.3.	Untersuchung der $\alpha 2$ -Bruchstücke	63
2.6.4.	Spaltung der Bruchstücke in kürzere Peptide mit Bromcyan	66
2.6.5.	Diskussion	69
3.	ZUSAMMENFASSUNG	73
4.	EXPERIMENTELLER TEIL	80
5.	LITERATUR	92

Die wesentlichsten Merkmale des Skleroproteins Kollagen, der Hauptkomponente des Bindegewebes, sind chemische Beständigkeit und mechanische Stabilität. Trotz einheitlicher Grundstruktur zeigen die makroskopischen Erscheinungsformen eine hohe Variabilität, die den speziellen Anforderungen in den verschiedenen Geweben beispielsweise in Haut, Sehnen, organischer Knochensubstanz, Dentin und Knorpel angepaßt ist.

Grundbaustein des Kollagens ist ein Molekül mit dem Molekulargewicht 285 000, das aus drei Polypeptidketten von je 1050 Aminosäuren aufgebaut ist. Bei dem Kollagentyp, der vorherrschend in Haut, Sehnen und Knochen ist, wird das Molekül aus zwei identischen $\alpha 1$ - und einer ähnlichen, aber genetisch differenten $\alpha 2$ -Kette gebildet [1]. Die Ketten liegen in einer Polyprolinhelix vor und sind um eine gemeinsame Achse zu einer gegenläufigen Schraube verdreht. Diese tripelhelikale Struktur bedingt die Starrheit und stabförmige Gestalt des $14 \times 2900 \text{ \AA}$ messenden Moleküls. Voraussetzungen für die Ausbildung der Konformation und damit gleichzeitig kennzeichnend für die Primärstruktur sind der hohe Iminosäuregehalt und das Auftreten von Glycin in jeder dritten Stelle. Röntgenstrukturdaten haben gezeigt, daß abwechselnd aus jeder Kette ein Glycin den Platz im Inneren der Helix einnimmt und von diesem Rest eine H-Brückenbindung ausgeht [2,3]. An beiden Enden schließen die Ketten mit kurzen nichthelikalen Bereichen ab, die nicht die strenge Wiederholung der Glycinreste zeigen und deshalb auch nicht die tripelhelikale Konformation einnehmen können. Der in diesem Abschnitt anscheinend immer vorkommende Lysinrest spielt eine entscheidende Rolle für die Quervernetzung.

Eine Besonderheit bei der Biosynthese stellt die Hydroxylierung eines Teils der Prolin- und Lysinreste und die anschließende Glykosylierung bestimmter Hydroxyl-Lysinreste dar. Weiterhin wurde neuerdings festgestellt, daß die Polypeptidkette in einer Vorläuferform, dem Prokollagen, synthetisiert wird [4,5,6]. Die Sequenz ist demnach ursprünglich um einen Bereich am N-Terminus verlängert, der in seiner Zusammensetzung neben dem hohen Cysteingehalt auch sonst völlig vom helikalen Teil abweicht [5,7,8]. Diese "additional peptides" fixieren, wie man annimmt, die Ketten im richtigen Raster für die Ausbildung der Tripelhelix und verhindern andererseits die Ablagerung von Fibrillen in der Zelle. Im extrazellulären Raum findet eine sehr spezifische Abspaltung statt und die Moleküle können sich nun parallel und um etwa ein Viertel ihrer Länge gegeneinander versetzt zu Fibrillen zusammenlagern. Die Steuerung der Fibrillenbildung erfolgt offensichtlich durch das charakteristische Ladungsmuster der Moleküle, das durch den Wechsel apolarer und polarer Bereiche zustandekommt, in denen hydrophobe beziehungsweise polare und geladene Seitengruppen angereichert sind [9,10,11]. Diese diskontinuierliche Verteilung läßt sich im Elektronenmikroskop sichtbar machen. Fällt man Lösungen von Monomeren und ATP, bilden sich Segmente parallel aneinander gelagerter, mit gleichen Enden abschneidender Moleküle (SLS). Bei "positiver Anfärbung" adsorbieren die polaren Bereiche Uranylacetat und Phosphorwolframsäure und ergeben dadurch ein entsprechendes Querstreifungsmuster.

Wichtig für die Stabilisierung des Fibrillenverbands und die sich daraus ergebenden mechanischen Eigenschaften ist die Knüpfung kovalenter Bindungen zwischen den Molekülen, bezeichnet als intermolekulare Quervernetzung. In einem ersten, enzymatisch kontrollierten Schritt, der höchstwahrscheinlich auf die nichthelikalen Bereiche beschränkt ist, werden

Lysin- oder Hydroxylysinreste oxidativ desaminiert [12,13]. Dabei entsteht der d-Semialdehyd der α -Aminoadipinsäure (Allysin) beziehungsweise die entsprechende Hydroxyverbindung. Die eigentliche Quervernetzungs-komponente ist dann eine Schiffsche Base, die aus der Reaktion eines Allysins mit einem im helikalen Teil gelegenen Lysin oder bevorzugt Hydroxylysin hervorgeht [14-16]. Diese Verbindung ist in verdünnten Säuren nicht beständig, sie wird erst in einem weiteren, bisher nicht bekannten Schritt in eine stabile Form überführt.

Sind dagegen die Ketten innerhalb des Moleküls kovalent verbunden, spricht man von intramolekularer Quervernetzung. Sie tritt allem Anschein nach nur im N-terminalen Bereich auf und entsteht durch Aldoladdition von einander gegenüberliegenden Allysinresten [16-18]. Diese Quervernetzungs-komponente, eine Carbonylverbindung, ist im Gegensatz zur Aldiminbindung in saurer Lösung stabil. Sie führt zu dimeren β - und etwas seltener γ -Komponenten, so können zwei gleiche Ketten zu $\beta 11$, die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette zu $\beta 12$ oder alle drei Ketten zu $\gamma 112$ verknüpft sein. Da die Aldole durch Dehydratisierung leicht in reaktive α, β -ungesättigte Carbonylverbindungen übergehen, können daran weitere Reaktionen z.B. nochmals Schiff-Basenbildung erfolgen, wodurch möglicherweise polyfunktionelle Vernetzungsstellen entstehen [18-22].

Als gute Bestätigung für den Chemismus konnten aus Gesamthydrolysaten unterschiedlich vernetzter Kollagene nach Stabilisierung mit ^3H -markiertem Natriumborhydrid die reduzierten Formen der Allysinvorstufen, der Aldimin- und Aldolverbindungen, sowie komplizierterer Komponenten von noch weitgehend unbekannter Struktur isoliert werden (Übersicht [23,24]).

Eine erste Vorstellung über die Lokalisierung der Querver-

netzungen hatte man durch elektronenmikroskopische Untersuchungen [25,26] erhalten, nach Kühn et al war zwischen drei Typen zu unterscheiden [25,26]. Viele Kombinationsmöglichkeiten bietet die "side-to-side"-Bindung, mit der die Viertelversetzung in der Fibrille fixiert wird. Gewissermaßen ein Spezialfall dieses Typs ist die "head-to-tail"-Verknüpfung, hierbei überlappt ein Molekül mit seinem Aminoende das Carboxylende eines Nachbarmoleküls um 300 Å [10,27]. Es treten im Fibrillenverband aber auch Moleküle auf, die gegenüber einem Nachbarn nicht versetzt sind, sondern mit gleichen Enden abschließen. Diese Anordnung ermöglicht eine "end-to-end"-Vernetzung, das heißt die Bindung über gleiche Enden [10], eventuell wie bei der intramolekularen Quervernetzung auch durch Aldolreaktion. Säurelösliches Kollagen enthält als Quervernetzungs-Komponenten fast ausschließlich die des letztgenannten Typs, dagegen bewirkt das Auftreten stabiler "side-to-side"-oder "head-to-tail"-Bindungen anscheinend einen sehr raschen Übergang in den unlöslichen Zustand.

Einen eindeutigen Hinweis auf die Beteiligung der nicht helikalen Bereiche an der Quervernetzung lieferte die Inkubation nativer Kollagenlösungen mit proteolytischen Enzymen unter Bedingungen, bei denen die tripelhelikale Struktur gewahrt blieb. Die Experimente ergaben, daß infolge der limitierten Enzymbehandlung der Anteil monomerer Moleküle erheblich zunahm, unter geeigneten Bedingungen konnte sogar unlösliches Kollagen monomer in Lösung gebracht werden [25,28,29]. Nach Denaturierung der behandelten Probenlösungen wurden hauptsächlich Einzelketten gefunden, es waren also sowohl inter- als auch intramolekulare Quervernetzungen gespalten worden.

Zum völligen Verständnis der Vorgänge, die zur Bildung der funktionstüchtigen Strukturen führen, und der Faktoren, die

Ihren normalen Ablauf stören können, ist die Aufklärung der Primärstruktur unumgänglich. Besondere Schwierigkeiten bereitet dabei die ungewöhnliche Länge der Polypeptidketten. Unter diesem Gesichtspunkt ein entscheidender Fortschritt war daher die Anwendung der Bromcyanspaltung nach Gross und Witkop [30] am Kollagen durch Bornstein und Piez [31]. Wegen des niedrigen Methioningehalts erhält man eine relativ geringe Zahl an Peptiden, die dann mit den in der Strukturanalyse üblichen Methoden analysiert werden können. Für die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette ergibt sich ein unterschiedliches Peptidmuster, das sich dagegen bei Ketten gleichen Typs von verschiedenen Spezies weitgehend oder völlig entspricht. Da zuerst die Bromcyanpeptide der Ratte näher untersucht wurden, vereinbarte man auf dieser Basis eine einheitliche Nomenklatur [32-35]. Die $\alpha 1$ -Kette in Kalbshautkollagen enthält sieben Methioninreste. Die Spaltung führt folglich zu acht Peptiden, deren Sequenzbestimmung in jüngster Zeit erfolgreich abgeschlossen werden konnte [36-46], bis auf das Peptid $\alpha 1$ -CB8, an dem dies jedoch bei der Ratte gelang [47].

Von der $\alpha 2$ -Kette (Kalb) liegen dagegen bis jetzt nur die Sequenzen einiger kurzer Abschnitte vor. Ein Engpaß im Vergleich zu $\alpha 1$ war die Darstellung genügender Mengen an $\alpha 2$. Einmal hat Kollagen prinzipiell einen niedrigeren $\alpha 2$ -Gehalt und dann ist $\alpha 2$ besonders bei steigendem Polymerenanteil mit anderen Komponenten stark überlagert, die bei der $\alpha 1$ -Abtrennung überhaupt nicht stören. Weiterhin ergab die Isolierung der Bromcyanpeptide, daß auch die Verteilung der Methioninreste in $\alpha 2$ wesentlich ungünstiger ist. Abgesehen davon, daß beim Bromcyanabbau nur fünf Peptide (gegenüber acht in $\alpha 1$) entstehen [48], umfassen die beiden großen Peptide $\alpha 2$ -CB4 mit 321 und $\alpha 2$ -CB3,5 mit etwa 660 Resten allein über 95% der Kette. Es bestand allerdings die Aussicht, die genannten Schwierigkeiten wenigstens zum Teil zu umgehen.

Durch gezielte Abspaltung von Quervernetzungsbereichen konnte man den Gesamtanteil an Monomeren im löslichen Kollagen erhöhen, als weitere Möglichkeit bot sich an, durch limitierte Kollagenasespaltung verschieden lange Fragmente des nativen Moleküls und daraus wiederum überlappende $\alpha 2$ -Peptide herzustellen (näher beschrieben unter 2.6.). Die Kollagenasespaltung hatte sich bereits für die Bestimmung der $\alpha 1$ -Struktur als wertvolle Hilfe erwiesen.

1.1. AUFGABENSTELLUNG

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Untersuchungen an der $\alpha 1$ -Kette bereits fortgeschritten, daher sollten als Beitrag zur vollständigen Aufklärung der kovalenten Struktur des Kalbshautkollagens die übrigen Komponenten im löslichen Anteil isoliert und charakterisiert werden. Der wichtigste Aspekt hierbei war, einen Zugang zur späteren, völligen Sequenzierung der $\alpha 2$ -Kette herzustellen. Dies führte zu folgendem Arbeitsprogramm:

- 1) Bei der Präparation war zunächst die Verteilung ein- und mehrkettiger Komponenten in verschiedenen Kollagenextrakten und die Möglichkeit der $\alpha 2$ -Separierung zu untersuchen. Wegen grundsätzlich niedrigeren $\alpha 2$ -Gehalts und des weniger günstigen chromatographischen Verhaltens (Überlagerung durch β - und höhere Komponenten) an CM-Cellulose war mit einer bedeutend geringeren Ausbeute als bei $\alpha 1$ zu rechnen.
- 2) Als Alternative zu 1) sollte geprüft werden, inwieweit nur geringfügig verkürzte, im wesentlichen aber unveränderte $\alpha 2$ -Ketten zu gewinnen waren. Hierfür waren qualitative und quantitative Veränderungen nach modifiziertem Abbau nativer Kollagenlösungen mit verschiedenen Enzymen oder Bromcyan auszuwerten.
- 3) Anknüpfend an die Darstellung verkürzter Ketten durch limitierten Abbau sollten die am Aminoende nativer Moleküle abspaltbaren Bereiche untersucht werden, dazu gehörte:
 - a) Isolierung der N-terminalen Bromcyanpeptide und eine weitgehende Charakterisierung des entsprechenden

α 2-Peptides,

b) Sequenzierung des N-terminalen Bereichs von α 2.

4) Die bekannten und neu gewonnenen Daten über terminale Bereiche sollten als Ausgangsbasis dazu dienen, Quervernetzungspeptide am Amino- und Carboxylende genauer zu analysieren.

5) Da die Bromcyanpeptide α 2-CB4 und besonders α 2-CB3,5 für die Strukturaufklärung wegen ihrer Größe sehr schwer zu handhaben waren, sollte die Kette durch Kombination von limitiertem Kollagenaseabbau und Bromcyanspaltung in kleinere Einheiten zerlegt werden mit dem Ziel:

- a) Geeignete Peptide für die Sequenzierung zu gewinnen,
- b) kürzere Abschnitte der Kette näher zu beschreiben, um detailliertere Untersuchungen daran vorzubereiten. In diesem Rahmen war auch eine endgültige Zuordnung der α 2-Bromcyanpeptide zu erwarten.

1.2 ABKÜRZUNGEN

$\alpha 2(78)$	Bruchstück der $\alpha 2$ -Kette, entstanden durch Kollagenasebehandlung (Länge des entsprechenden Molekülfragments in nm)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
CB-Peptide	Bromcyan-Peptide (cyanogen bromide)
CM-Cellulose	Carboxymethyl-Cellulose
NLK	Neutralsalzlösliches Kollagen
PCA	Pyrrolidoncarbonsäure (= pGlu)
PTH	Phenylthiohydantoin-Derivate
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium- ...)
SLK	Säurelösliches Kollagen
SLS	Molekülzusammenlagerungen bei ATP-Fällung (segment-long-spacing)
TPCK	N-Tosylamido-2-phenyl-äthylchloromethyl-keton
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

2. ERGEBNISSE

2.1. Präparation von löslichen Komponenten

2.1.1. Natives Kollagen

Frische, zerkleinerte Kalbshaut wurde bei 4°C zur Erzielung möglichst hoher Ausbeuten erschöpfend mit Neutralsalz und im Säuren nacheinander mit Citratpuffer, 0,5% Essigsäure und 0,25 m Milchsäure extrahiert. Die Lösungsmittel zeigen in dieser Reihenfolge ein steigendes Quellvermögen, der in Milchsäure unlösliche Rückstand bestand schließlich zum größten Teil aus einer stark gequollenen, glasig durchscheinenden Gallerte. Die Untersuchung der Lösungen am Elektronenmikroskop machte deutlich, daß bei der Extraktion eine gewisse Fraktionierung der löslichen Komponenten stattgefunden hatte. So wurden bei neutralsalzlöslichem Kollagen (NLK) überwiegend Einzelmoleküle, bei säurelöslichem (SLK) zunächst eine wachsende Zahl an Dimeren (Citratextrakt) und dann zusätzlich von längeren Polymeren (Essigsäure-, Milchsäureextrakt) beobachtet.

Parallel dazu resultierte eine Viskositätszunahme, besonders ausgeprägt im Milchsäureextrakt trotz dessen relativ niedrigen Kollagengehalts (vgl. Tabelle 1). Frühere Messungen hatten mit zunehmendem Polymerengehalt eine steigende Konzentrationsabhängigkeit der reduzierten Viskosität ergeben [26].

Die verschiedenen Kollagenlösungen wurden denaturiert und an Molekularsieb, CM-Cellulose und in der Diskelektrophorese auf ihre Komponenten hin untersucht. Ein besonderer Gesichtspunkt von der Aufgabenstellung her war, die Möglichkeiten zur Isolierung von α 2-Ketten zu prüfen.

Eine gute Charakterisierung nach Komponenten unterschiedlicher Größe und damit die Bestimmung des α -Gehalts in den Extrakten erlaubte die Molekularsiebchromatographie. In Abb. 1 sind die Trennungen von NLK (a) und Essigsäureextrakt (b) an Bio-Gel A-15 gegenübergestellt.

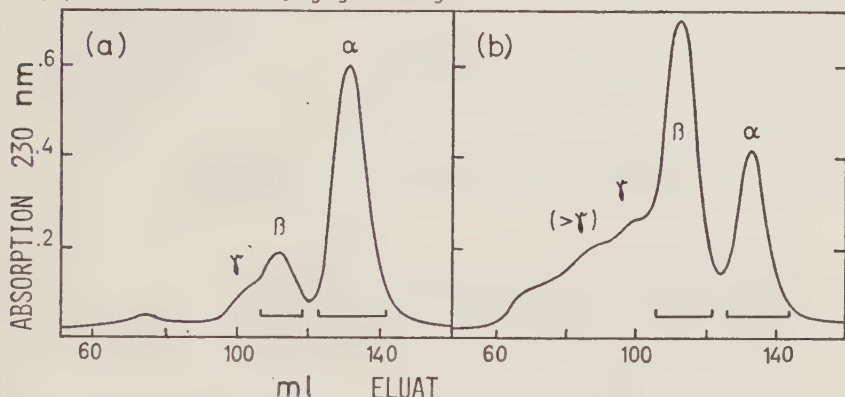


Abb. 1: Chromatographie von neutraler (a) und essigsäurelöslicher (b) Kollagen an Bio-Gel A-15 in 1 M CaCl_2 -Puffer (Tris-HCl, pH 7,5) bei Raumtemperatur. Säule: 1,5x118 cm ($>\gamma$) = höhere Polymere

Das NLK bestand überwiegend aus Einzelketten, wogegen beim Essigsäureextrakt der β -Anteil größer war und auch γ -Komponenten und höhere Polymere mehr in Erscheinung traten. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über Ausbeuten und Mengenverhältnisse der Komponenten in den einzelnen Extrakten. Tabelle 1 ist zu entnehmen, daß trotz des hohen α -Anteils von rund 70% in NLK die Gesamtausbeute an α gering war. Citratlösliches Kollagen enthielt bei verschiedenen Aufarbeitungen (vgl. Tabelle 2) 35 bis 45% α -Ketten. Bei den übrigen Extrakten sank der α -Anteil mit dem Anstieg der Polymeren weiter ab.

Trotz des etwas besseren Auflösungsvermögens von Bio-Gel A-15 oberhalb des α -Bereichs, wurde bei späteren Trennungen statt-

TABELLE 1

Extrakt	Konzentration ^{x)} [mg/ml]	Ausbeute ^{xx)} [g/kg]	Verhältnis ^{xxx)} $\alpha:\beta:\gamma$ +Polymere
NLK	1,4	4,4	72 : 21 : 7
Citrat	4,5	29,5	35 : 41 : 24
Essigsäure	3,1	82	25 : 45 : 30
Milchsäure	0,5	11,5	13 : 22 : 65

Tabelle 1: Vergleich der verschiedenen nativen Kollagen-
präparationen

- x) Kollagen-Konzentration jeweils im ersten Extrakt
 xx) Ausbeute [g] bezogen auf das Feuchtgewicht [kg]
 xxx) Prozentuales Verhältnis (Gew.%) - Planimeterwerte der Peak-
 flächen von Bio-Gel A-15

dessen Bio-Gel A-1,5 wegen größerer Stabilität der Säulen-
 füllung und mengenmäßig höherer Trennleistung benutzt.

Die Separierung von Komponenten gleicher Größe wie etwa
 der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten wurde an der Ionenaustauschersäule
 vorgenommen. Die Chromatographie von NLK an CM-Cellulose
 (nach Piez et al [1]) zeigt Abb. 2.

Der dominierende $\alpha 1$ -Peak enthielt, als schwache Schulter
 sichtbar, nur geringe Mengen an $\beta 11$. Die $\beta 12$ -Komponente
 folgte deutlich abgesetzt und überschneidet sich mit dem an-
 schließenden $\alpha 2$ -Peak. In Übereinstimmung mit den Trennungen
 am Molekularsieb ergab sich bei den säurelöslichen Präpara-
 ten eine Verschiebung zugunsten des β -Gehalts, wobei an
 CM-Cellulose besonders deutlich der $\beta 12$ -Anstieg zu sehen
 war, der die $\alpha 2$ -Abtrennung beeinträchtigte (vgl. Abb. 6a).

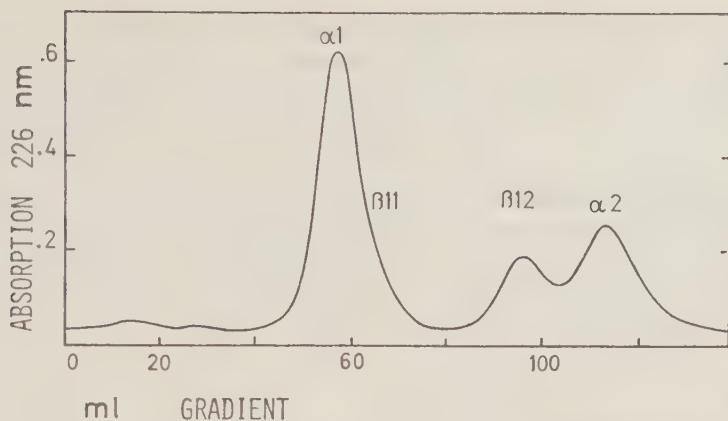


Abb. 2: Trennung von neutralsalzlöslichem Kollagen an CM-Cellulose in 0,06m Natriumacetat, pH 4,8 mit einem linearen Gradienten von 0-0,1 NaCl über ein Gesamtvolumen von 200ml bei 40°C. Säure 1,7x7cm.

Alle Kollagenlösungen wurden in der Diskelektrophorese nach Reisfeld [49] charakterisiert. Bei dieser Art der Trennung hat neben der Separierung nach Molekülgröße die unterschiedliche Ladung der Komponenten einen Einfluß auf die Wanderungsgeschwindigkeit. So ließen sich die Aussagen von Molekularsieb- und CM-Cellulosechromatographie bestätigen, wobei allerdings nur eine grobe quantitative Abschätzung der Verteilung der einzelnen Komponenten möglich war.

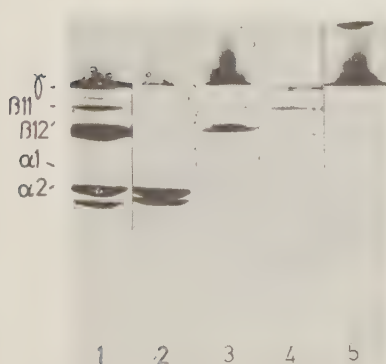


Abb. 3: Diskelektrophorese (Reisfeld) von Milchsäureextrakt (1) und den zugehörigen Fraktionen von Bio-Gel A-15: (2) α -Ketten, (3) β -, (4) γ -Komponenten und (5) höhere Polymere. Laufzeit 4 Stunden

In Abb. (3) ist die Diskelektrophorese des Milchsäureextrakts und der einzelnen Peaks von Bio-Gel A-15 gezeigt. Der größte Teil der Polymeren drang nicht ins Trenngel ein, die γ -Fraktion lieferte eine prominente Bande, die β -Fraktion spaltete in eine schwache β_{11} - und eine starke β_{12} -Bande auf. Der etwas geringere α -Anteil separierte deutlich in die α_1 - und α_2 -Komponente. Das Beispiel macht deutlich, daß der Vorteil dieser Trennmethode mehr in der schnellen Charakterisierung verschiedener Säulenfraktionen als bei einer quantitativen Beurteilung lag.

2.1.2. Denaturierende Extraktion

Eine andere Möglichkeit, lösliches Kollagen, wenn auch in denaturierter Form, herzustellen, war die wiederholte Extraktion mit 8M Harnstofflösung. Der erste Extrakt (eine halbe Stunde) wurde verworfen, da er nach Diskelektrophorese und CM-Cellulosechromatographie noch einen hohen Anteil anderer Proteine enthielt. Bei etwa zweistündiger Harnstoffeinwirkung ähnelte die Zusammensetzung der gewonnenen Lösung citratlöslichem Kollagen. Die erhebliche Zeitersparnis gegenüber der nativen Aufarbeitung läßt sich am besten daran ermessen, daß nach insgesamt 15 Stunden rund 50 g Kollagen pro kg Feuchtgewicht gelöst werden konnten. Auch hier war die Zunahme von β -Komponenten und höheren Polymeren bei längerer Extraktionsdauer zu beobachten.

2.1.3. Isolierung der α_2 -Kette

In Neutralsalzpuffer ging nur wenig Kollagen in Lösung, so daß hieraus trotz des hohen Monomerenanteils nicht genügend α_2 -Ketten gewonnen werden konnten. Daher mußten

α 2-Ketten auch aus Citrat- und Harnstoffextrakt (maximal 3-4 Stunden extrahiert) isoliert werden, was mit einem bedeutend größeren Trennaufwand verbunden war. Die wiederholte Extraktion mit Citratpuffer und anschließend mit stärker quellend wirkenden, verdünnten Säuren oder mit Harnstofflösung ergab zwar gute Ausbeuten an löslichem Kollagen, zeigte aber verbunden mit dem Ansteigen von β - und höheren Komponenten eine Abnahme der monomeren α -Ketten. Die Abtrennung des α 2-Anteils wurde darüber hinaus wegen starker Überlagerung mit wachsendem β 12-Gehalt an Ionenaustauscher und Molekularsieb erschwert. Die Verwendung von Harnstoff ermöglichte immerhin eine Vereinfachung in der Rohextraktherstellung.

Zur Präparation größerer α 2-Mengen wurde die entsprechende Fraktion von CM-Cellulose noch ein- bis zweimal im gleichen System rechromatographiert. Bei citratlöslichem Kollagen betrug die α 2-Ausbeute nach der ersten Chromatographie etwa 10% des eingesetzten Kollagens. Anschließend wurde an Bio-Gel A-1,5 getrennt und die gewonnene α 2-Kette in der Disk-elektrophorese auf Reinheit geprüft.

Für analytische Zwecke (Aminosäureanalyse, Sequenzierung) wurde lösliches Kollagen im ersten Schritt an Bio-Gel A-1,5 aufgetragen, die α -Fraktion an einer kleinen CM-Cellulosesäule in α 1- und α 2-Kette aufgetrennt (gezeigt an NLK in Abb. 4) und α 2 nochmals am Molekularsieb gereinigt.

Diese Reihenfolge hatte den Sinn, die verglichen mit α 1 weniger stabile α 2-Kette so kurz wie möglich der für die CM-Cellulose-trennung nötigen Temperatur (40°C) auszusetzen und mit wenigen Chromatographieschritten einen hohen Reinigungsgrad zu erzielen. Gemessen am Zeitaufwand war dagegen dieser Weg weniger effektiv, da an Bio-Gel A-1,5 im Vergleich zu CM-Cellulose nur ein Bruchteil der Proteinmenge

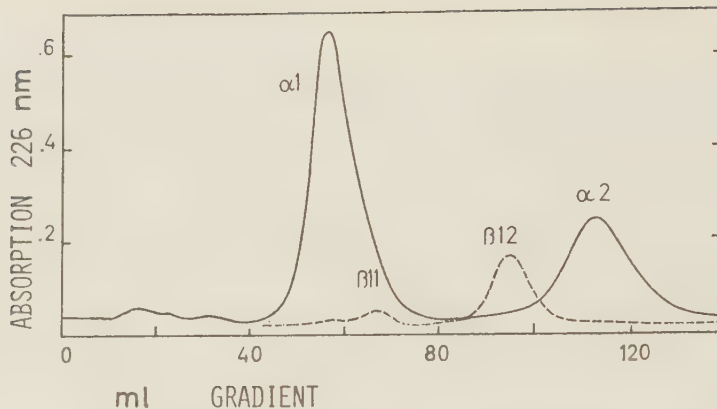


Abb. 4: Rechromatographie der α - und β -Fraktion von Abb. 1a (NLK an Bio-Gel A-1,5) an CM-Cellulose. Bedingungen siehe Abb. 2
 α = durchgezogene, β = unterbrochene Linie

in einem Mehrfachen an Zeit getrennt werden konnte.

2.2. Abspaltung nichthelikaler Bereiche vom nativen Molekül

Isolierung verkürzter α 2-Ketten

Da die Herstellung der für die Strukturuntersuchungen nötigen α 2-Mengen im Vergleich zu α 1 sehr aufwendig und schwierig war, wurde nach Wegen zur Isolierung möglichst geringfügig veränderter α 2-Ketten gesucht.

Kühn et al. hatten in Elektronenmikroskop und Ultrazentrifuge die Zunahme von Einzelkomponenten nach modifizierter Behandlung mit verschiedenen Proteasen gezeigt, ohne daß dabei eine sichtbare Verkürzung feststellbar war [25]. Bornstein, Kang und Piez untersuchten das Verhalten der nach Enzym- oder Bromcyanabbau am nativen Kollagen gebildeten α -Ketten an

CM-Cellulose [50].

Durch Abspaltung nichthelikaler Quervernetzungsbereiche sollte es also möglich sein, auch bei höherem β 12-Gehalt einen relativ hohen Anteil von nur geringfügig verkürzten α 2-Ketten im präparativen Maßstab zu isolieren. Auch konnten sich daraus, falls einheitliche Spaltstellen vorlagen, Möglichkeiten für die Charakterisierung des N-terminalen Teils der α 2-Kette ergeben.

2.2.1. Proteolytischer Abbau

Natives Kollagen wurde mit den Enzymen Pepsin, Chymotrypsin und Pronase unter den jeweils angegebenen Bedingungen unterhalb der Denaturierungstemperatur inkubiert. Die einzelnen Ansätze wurden nach Abstoppen des Abbaus durch Dialyse gegen 15%-igen KCl-Puffer (Phosphat pH 7,2) gefällt, um die eingesetzten Enzyme weitgehend zu entfernen, und die Präzipitate zur völligen Inaktivierung in 8 m Harnstoff gelöst. Für die anschließende Trennung an CM-Cellulose wurde an Bio-Gel P-2 in Startpuffer (pH 4,8) entsalzt. Die isolierten α 2-Fraktionen wurden an Bio-Gel A-1,5 und nochmals an CM-Cellulose chromatographiert.

Pepsin

Unter den gewählten milden Reaktionsbedingungen (pH 1,5, 18 Stunden, 18°C) wurde an CM-Cellulose keine größere Veränderung gegenüber dem Ausgangsmaterial (Citratextrakt) beobachtet, der β 12-Anteil war nur unbedeutend reduziert. Eine einheitliche α 2-Komponente, bezeichnet als α 2^P, wurde nach Chromatographie wie eingangs angegeben erhalten. Von Interesse war die Frage, ob trotz relativ breiter Spezifität des Pepsins ein definierter einheitlicher N-Terminus auftrat.

Chymotrypsin

Nach Chymotrypsinbehandlung wurde an CM-Cellulose vor allem die drastische Verminderung der β_{12} -Komponente deutlich. Die beiden α -Peaks (entsprechend vergrößert) erschienen verglichen mit unveränderter α_1 - und α_2 -Kette bei etwas höherer Ionenstärke (Abb. 5), für sie wurde die Bezeichnung α_1^C und α_2^C gewählt.

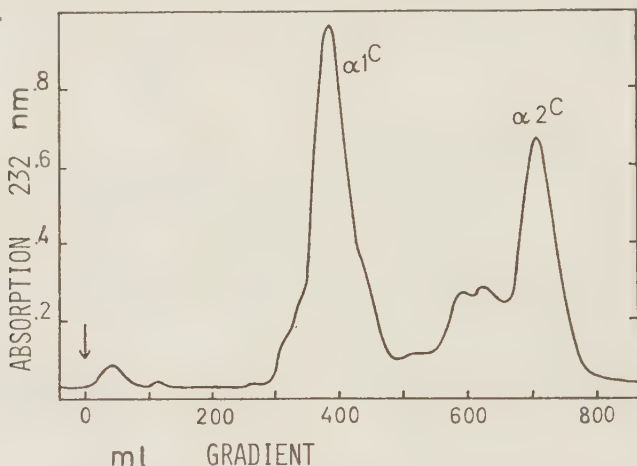


Abb. 5: Trennung von nativ mit Chymotrypsin behandeltem Citratextrakt an CM-Cellulose unter Bedingungen wie Abb. 2 mit einem Gradienten über das Gesamtvolumen von 1000 ml. Säule: 2,5x15 cm.

(+) Beginn des Gradienten

Die Charakterisierung der CM-Cellulosefraktion in der Dis-elektrophorese zeigte für die α_1^C -Fraktion eine Hauptbande neben drei kleineren Nebenbanden ebenfalls im α -Bereich, was auf eine gewisse Heterogenität hinwies. Praktisch völlig verschwunden war die β_{11} -Komponente. Die β_{12} -Fraktion enthielt noch etwas α , der folgende Zwischenpeak neben α -Ketten und β -Komponenten noch geringe Mengen niederer Degradationsprodukte. Der etwas verzögerte α_2^C -Peak lieferte eine einzelne,

scharfe Bande, Übereinstimmend mit dem Bild an Bio-Gel A-1,5.

Pronase

Die Spaltung vernetzter Komponenten unter entsprechenden Abbaubedingungen wie bei Chymotrypsin war mit Pronase noch vollständiger. Dieses Resultat stimmte mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen überein [25]. Die Charakterisierung einer Spaltstelle in der $\alpha 2$ -Kette gelang bei der Sequenzierung (siehe dort) der verkürzten, mit $\alpha 2^{\text{Pr}}$ bezeichneten Kette.

Das Resultat der Behandlung mit den verschiedenen Enzymen ähnelte sich insofern, als die isolierten $\alpha 2$ -Ketten am Molekularsieb einheitlich im α -Bereich chromatographierten. Die beschriebene Pepsinbehandlung war hinsichtlich der Reduzierung des β -Anteils wenig effektiv, durch Chymotrypsin und Pronase konnten neben terminalen Quervernetzungspeptiden am Aminoende auch solche vom Carboxylende abgespalten worden sein. Eine spezifische Abtrennung nur der N-terminalen Bereiche und damit eventuell eine konkretere Aussage über die Verteilung der Quervernetzungen war dagegen von der limitierten Bromcyanspaltung (bei 15°C) zu erwarten.

Bornstein et al. hatten an Ratte mit dieser Methode von beiden Ketten nur kurze N-terminale Peptide abgespalten, wobei analog zur oben beschriebenen Enzymbehandlung die native Struktur der Ketten erhalten blieb [17,50]. Aus Abb. 29, wo die Lage der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Bromcyanpeptide dargestellt ist, wird ersichtlich, daß bei Wahrung der tripelhelikalen Struktur auch hier der Bromcyanangriff nur in der Nähe des Aminoendes erfolgen konnte.

2.2.2. Limitierter Bromcyanabbau

Für den limitierten Abbau wurde natives, säurelösliches Kalbhautkollagen (etwa 3 mg/ml) bei 4°C mit 1N HCl auf pH 1,0 eingestellt und bei 15°C mit Bromcyan inkubiert [17]. Nach Abkühlen und Abstoppen des Abbaus wurde entweder gefriergetrocknet oder gegen CM-Cellulosestartpuffer (pH 4,8) dialysiert.

In diesen Experimenten wurde zunächst der Zeitablauf der Reaktion kontrolliert, im Anschluß daran wurden die Komponenten in den verschiedenen Extrakten auf Veränderungen hin untersucht und ergänzend dazu die abgespaltenen Bruchstücke charakterisiert.

Um den Reaktionsverlauf zu verfolgen, wurde citratlösliches Kollagen verschieden lange inkubiert und anschließend an CM-Cellulose aufgetrennt, die zeitabhängigen Veränderungen macht Abb. 6 deutlich. Im beschriebenen Versuch betrug die Inkubationszeit 14, 23, 40, 67, 92 und 114 Stunden.

Bereits nach 14 Stunden (Abb. 6b) erschienen neue Peaks kurz nach der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Fraktion. Nach 40 Stunden (6c) waren die ursprünglichen $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Gipfel sowie $\beta 12$ stark reduziert. Diese Veränderungen nahmen mit Verlängerung der Abbaupzeit weiter zu, zwischen 92 und 114 Stunden (6d) war dann kein merklicher Unterschied mehr festzustellen. Es resultierten zwei scharfe Peaks der verkürzten Ketten, bezeichnet als $\alpha 1^{CB}$ und $\alpha 2^{CB}$, im Verhältnis 2 : 1. Die nicht verkürzte $\alpha 1$ -Kette war als Vorschulter von $\alpha 1^{CB}$ an der ursprünglichen $\alpha 1$ -Position zu erkennen, außerdem ein breiter Doppelpeak im $\beta 12$ - und $\alpha 2$ -Bereich vor $\alpha 2^{CB}$. Eine Blindprobe (114 Stunden, pH 1, 15°C) verhielt sich bei der Trennung wie unbehandelte Kollagenlösung.

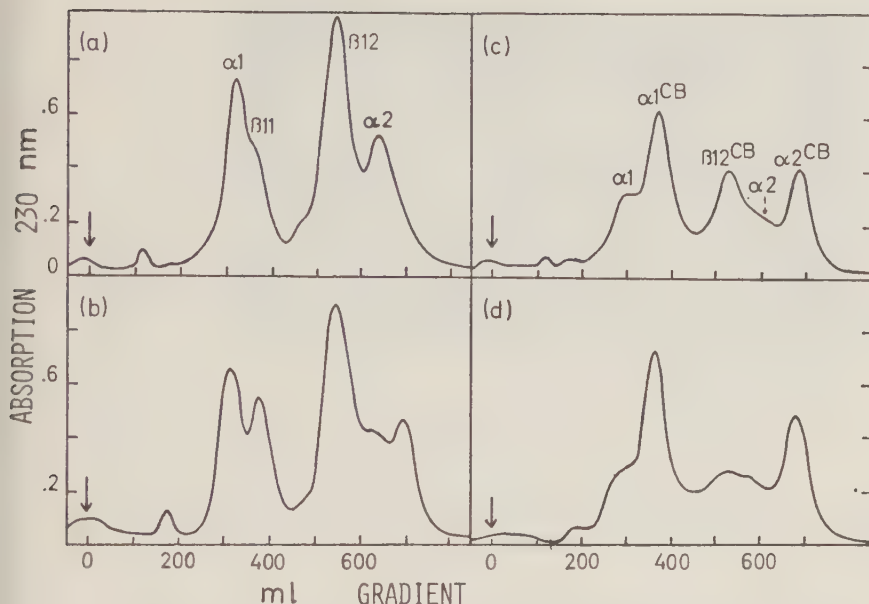


Abb. 6: Trennung von mit BrCN (15°) behandeltem Citrat-extrakt an CM-Cellulose unter gleichen Bedingungen wie Abb. 5. Die Chromatographie erfolgte nach Inkubationszeiten von 14(b), 40(c) und 114h(d); bei (a) der unbehandelte Extrakt.

(+) Beginn des Gradienten

Die in dieser Versuchsreihe auftretenden Veränderungen wurden auch in der Diskelektrophorese analysiert, was zu übereinstimmenden Ergebnissen führte (Abb. 7, 1-4). Nur brachte die höhere positive Bruttoladung der verkürzten α -Ketten, die am Celluloseaustauscher zu einer Verzögerung führte, eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit in Richtung Kathode mit sich.

Die $\alpha 1^{CB}$ -Kette, nach genügend langer Bromcyanbehandlung der Hauptanteil der $\alpha 1$ -Fraktion, wanderte in die ursprüngliche

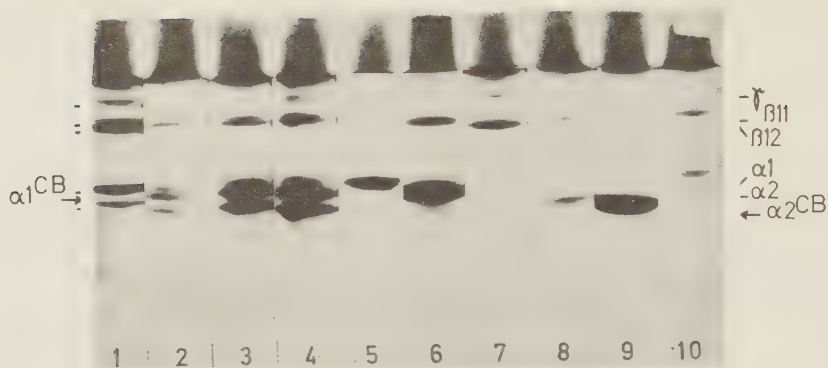


Abb. 7: Diskelektrophorese (Reisfeld) des nativ mit BrCN behandelten Citratextrakts (vgl. Abb. 6) nach Inkubationszeiten von 23(2), 67(3), 114h(4) und der CM-Cellulosefraktionen des 114h-Abbaus [(5)-(9) vgl. Abb. 6(d)]: (5) α_1 , (6) α_1^{CB} , (7) β_{12}^{CB} , (8) α_2 , (9) α_2^{CB} . (1) Ausgangsmaterial, (10) Blindprobe, 114h ohne BrCN inkubiert. Laufzeit 4 Stunden.

α_2 -Position, α_2^{CB} seinerseits etwa die gleiche Strecke weiter. In Ergänzung zur CM-Cellulosechromatographie war in der Diskelektrophorese eindeutig zu erkennen, daß auch nach 114 Stunden Abbau neben β_{12} - noch β_{11} -Komponenten, außerdem unverkürzte α_1 - und α_2 -Ketten enthalten waren, aber keine Kettenbruchstücke auftraten. Besonders klar ging das aus der Analyse einzelner CM-Cellulosefraktionen hervor (Abb. 7, 5-9).

In einem zweiten Versuch sollte geprüft werden, ob sich in Lösungen mit wesentlich höherem Polymerenanteil die Umwandlung in Einzelketten durch limitierten Bromcyanabbau im gleichen Ausmaß vollzog wie es bei Citratextrakt demonstriert worden war. Für einen derartigen Vergleich war am besten die Molekularsiebchromatographie geeignet, in Abb. 8 und 9 sind die Trennungen an Bio-Gel A-1,5 von Citrat- und Milchsäure-

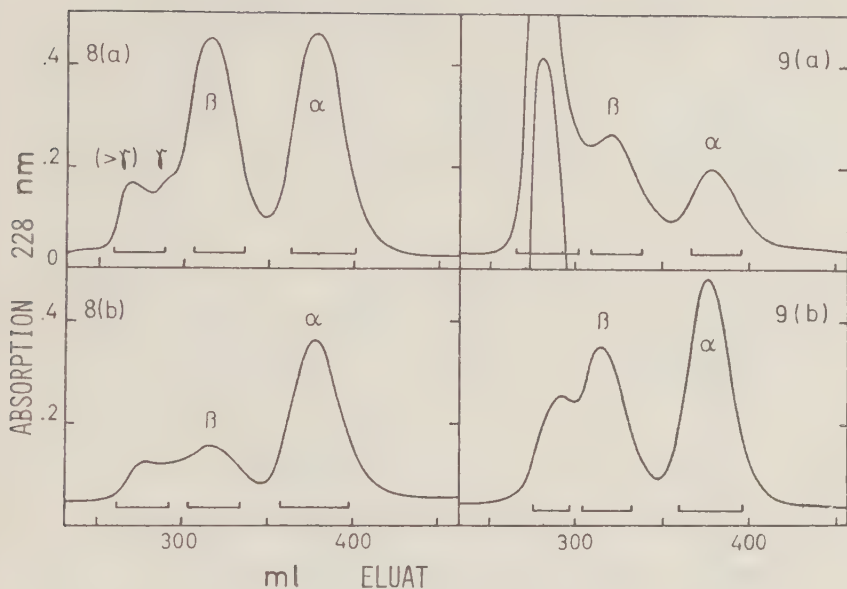


Abb. 8: Trennung von Citrateextrakt an Bio-Gel A-1,5 vor (a) und nach (b) 60h Inkubation mit BrCN (15°). Bedingungen wie Abb. 1. Säule: 1,5x118 cm.

Abb. 9: Trennung von Milchsäureextrakt an Bio-Gel A-1,5 vor (a) und nach (b) 70h Inkubation mit BrCN (15°). Bedingungen wie Abb. 1

(>γ) = höhere Polymere

extrakt vor und nach 60- bis 70-stündiger Inkubation gezeigt.

Wie erwartet eluierten die α -Ketten nach dem Abbau einheitlich und in unveränderter Position. Die Reduktion der höheren Polymeren war im Milchsäureextrakt noch ausgeprägter als bei Citrateextrakt, doch verblieb trotzdem ein höherer Restanteil an β -Komponenten. Betrachtet man die prozentualen Verhältnisse in Tabelle 2, so müßten neben α -Ketten auch β -Komponenten aus Polymeren neu entstanden sein. In Essig-

säure gelöstes Kollagen nimmt den Werten in dieser Zusammenstellung zufolge vergleichsweise eine Mittelstellung ein. Die unterschiedlichen Resultate bei den einzelnen Präparationen unterstreichen, daß, abgesehen von einer nicht ganz vollständigen Reaktion, noch Bindungen auftreten müßten, an denen die N-terminalen, abspaltbaren Bereiche keinen Anteil hatten.

TABELLE 2

Extrakt	Abbauzeit [Stunden]	Verhältnis - α : β :Polymere	
		unbehandelt	behandelt
Citrat	60	44 : 43 : 13	68 : 20 : 12
Essigsäure	60	30 : 41 : 29	59 : 24 : 17
Milchsäure	70	13 : 20 : 67	48 : 33 : 19

Tabelle 2: Prozentuales Verhältnis (Gew.%) der Komponenten in SLK-Extrakten vor und nach limitiertem BrCN-Abbau (Planimeterwerte der Peakflächen von Bio-Gel A-1,5)

Die an Bio-Gel A-1,5 getrennten α - und β -Fraktionen der behandelten Proben wurden an CM-Cellulose aufgeschlüsselt, in Abb. 10 ist das gezeigt von Citratextrakt (Peaks von Abb. 8b).

Hierbei wurde neben der Verzögerung der verkürzten α -Ketten am Ionenaustauscher deutlich das Verhältnis der α -Ketten wie 2 : 1 sichtbar. Bei der β 11- und β 12-Komponente ergab sich keine Verschiebung in der Elution, erwartungsgemäß auch nicht bei der restlichen verkürzten α 1-Kette, die daher als Marker herangezogen werden konnte.

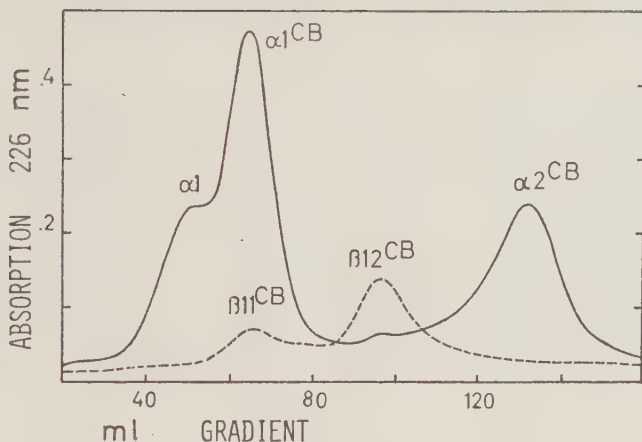


Abb. 10: Rechromatographie der α - und β -Fraktion von Abb. 8(b) an CM-Cellulose. Bedingungen und Säulenabmessung wie Abb. 2
 α = durchgezogene, β = unterbrochene Linie.

2.2.3. Vergleich der verkürzten Ketten

Begrenzter proteolytischer Abbau und Bromcyanbehandlung am nativen Molekül führten, gemessen am Verhalten in Ionenaustauschchromatographie und Diskelektrophorese zu ähnlichen Veränderungen. Die unveränderte Elution der Ketten am Molekularsieb zeigte, daß nur eine sehr geringe Verkürzung stattgefunden haben konnte. Das bestätigte auch im Rahmen der Fehlergrenze der Vergleich der Aminosäurezusammensetzung verschiedener $\alpha 2$ -Präparationen, zusammengefaßt in Tabelle 3.

Die Analyse zeigte nur bei der $\alpha 2^{\text{Pr}}$ -Kette (Pronase) deutlichere Abweichungen. Allerdings sollten insofern Unterschiede bestehen, als nach neueren Untersuchungen die $\alpha 2$ -Kette analog zu $\alpha 1$ [51] auch im C-terminalen Bereich mit nichthelikalen Sequenzen abschließt [52]. Es war folglich dort ebenso ein enzymatischer Angriff zu erwarten, dagegen keine Spaltung

	$\alpha 2$	$\alpha 2^C$	$\alpha 2^P$	$\alpha 2^{Pr}$	$\alpha 2^{CB}$
Hyp	83	82	85	79	84
Asp	50	48	50	47	49
Thr	18	17	18	16	17
Ser	29	27	26	24	28
Glu	75	71	74	74	72
Pro	119	117	114	109	115
Gly	348	341	326	353	327
Ala	103	100	101	105	104
Val	34	33	35	34	35
Met	3,6	2,7	3,3	2,1	2,3
Ile	19	18	19	19	19
Leu	35	33	35	35	36
Tyr	2,2	1,9	2,3	1,5	2,5
Phe	15	13	14	13	14
Hyl	11	11	9,3	7,4	10
His	7,8	8	8,2	7,0	8,1
Lys	21	22	23	18	20
Arg	56	54	57	56	57

Summe 1030

Tabelle 3: Aminosäurezusammensetzung von verkürzten^x $\alpha 2$ -Ketten im Vergleich zur ursprünglichen Kette. Berechnung der verkürzten Ketten auf 1000 Reste.

^x(C= Chymotrypsin, P= Pepsin, Pr= Pronase, CB= Bromcyan)

durch Bromcyan unter den genannten Bedingungen (in den durchgeführten Experimenten konnte in der $\alpha 2^{CB}$ -Kette kein Homoserin nachgewiesen werden). Andererseits führte die längere Bromcyaneinwirkung offensichtlich zur Veränderung eines Teils der Methioninreste im helikalen Bereich, was aber erst bei Nachspaltung der denaturierten Ketten (beschrieben bei Quervernetzung im C-terminalen Teil) festgestellt wurde. Der Vorteil einer erhöhten Ausbeute an

verkürzter $\alpha 2$ -Kette für die Primärstrukturuntersuchungen wurden dadurch eingeschränkt.

Wenn man von der C-terminalen Verkürzung absieht, war die Chymotrypsinbehandlung als präparative Methode am besten geeignet. Einmal verlief die Umwandlung in Einzelketten fast vollständig und zum andern verhielt sich die betreffende $\alpha 2$ -Fraktion ($\alpha 2^C$) in Diskelektrophorese, Ionenaustauscher- und Molekularsiebchromatographie völlig einheitlich. Bornstein et al. schlossen aus entsprechenden Versuchen an Rattenkollagen im N-terminalen Bereich beider Ketten auf eine einzige Spaltstelle nach dem ersten Methioninrest [50].

2.2.4. Abgespaltene Peptide

Da durch limitierten Bromcyanabbau definierte Peptide spezifisch am N-Terminus abgespalten wurden und die β -Verknüpfungsstelle größtenteils dort lokalisiert war, sollten diese Peptide näher untersucht werden. Sie konnten einmal bei der CM-Cellulosetrennung, zum andern wegen ihrer geringen Größe durch Dialysieren des Inkubationsgemischs abgetrennt werden.

Wurde nach Entfernen des Bromcyans und Gefriertrocknung das gesamte Proteingemisch an CM-Cellulose getrennt, enthielt das Eluat neben den Ketten auch die kurzen abgespaltenen Bruchstücke in einem Vorpeak bei Beginn des Gradienten. Dieser Peak wurde zunächst an Bio-Gel P-10 chromatographiert, um einen Gesamtüberblick über die Mengen- und Größenverhältnisse der Peptide zu gewinnen. Obwohl keine gute Auflösung erzielt wurde, konnte die Größe der Peptide auf rund zehn bis dreißig Aminosäuren eingegrenzt werden. Die Absorption war am höchsten im Bereich von etwa dreißig Aminosäuren (bei Präparation

aus Essigsäureextrakt). Eine weitere Untersuchung der Fraktionen führte zu qualitativ gleichen Aussagen wie das folgende Experiment.

Zur Isolierung der Abspaltprodukte aus dem Dialysat wurde bromcyanbehandeltes, citratlösliches Kollagen nach Entfernen des größten Teils des Reagenz im Vakuum (Wasserstrahlpumpe) bei $10-15^{\circ}\text{C}$ 24 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert. Das Außenmedium wurde im Vakuumverdampfer auf das geeignete Volumen eingeeengt und die Probe an Bio-Gel P-4 getrennt. Im Vergleich zu Bio-Gel P-10 war die Trennung im interessierenden Bereich besser, so daß zwei deutlich separierte Hauptfraktionen erhalten wurden (s. Abb. 11). Die Charaktere-

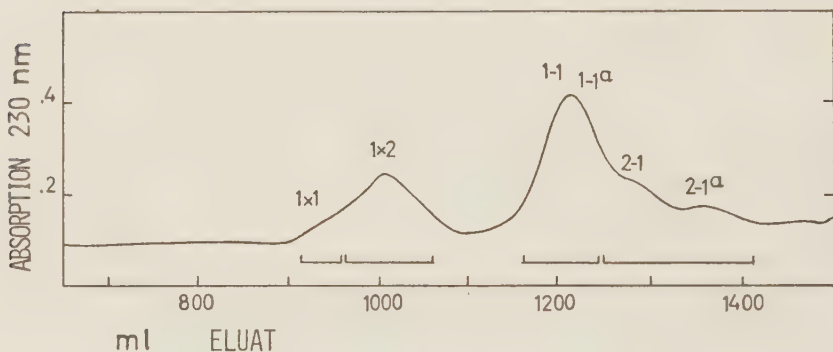


Abb. 11: Chromatographie an Bio-Gel P-4 von Peptiden aus dem Dialysat des Citratextrakts nach 60h Inkubation mit BrCN (15°). Elutionsmittel 0,1m Essigsäure, Säule: 4x145cm.

Bezeichnung: 1-1, 1-1^a = $\alpha 1\text{-CB1}$, $\alpha 1\text{-CB1}^a$; 1x1 = $\beta 11\text{-CB}(0,1x0,1)$
2-1, 2-1^a = $\alpha 2\text{-CB1}$, $\alpha 2\text{-CB1}^a$; 1x2 = $\beta 12\text{-CB}(0,1x1)$

risierung der in Abb. 11 gekennzeichneten Fraktionen wurde wie bei den Peptiden aus der Bromcyanspaltung (30°C) der isolierten $\alpha 1$ -und $\alpha 2$ -Ketten, sowie $\beta 11$ -und $\beta 12$ -Komponenten durchgeführt. Auf eine genauere Beschreibung soll hier ver-

zichtet werden, da sie in den nächsten Abschnitten erfolgt.

Das Ergebnis war, daß sowohl aus dem Vorpeak der CM-Cellulosetrennung als auch aus dem Dialysat des bromcyanbehandelten SLK die abgespaltenen, nichthelikalen Peptide der Einzelketten: $\alpha 1$ -CB0,1 und $\alpha 2$ -CB1 (in Lysin- und Allysinform), und der β -Komponenten: $\beta 11$ -CB(0,1x0,1)^x und $\beta 12$ -CB(0,1x1)^x gewonnen werden konnten. Bromcyanpeptide aus dem helikalen Bereich traten nicht auf, auch konnten kürzere Homoserinpeptide nicht gefunden werden.

^xDas Quervernetzungspeptid aus zwei $\alpha 1$ -CB0,1-Peptiden wird als $\beta 11$ -CB(0,1x0,1) bezeichnet, das aus $\alpha 1$ -CB0,1 und $\alpha 2$ -CB1 entsprechend $\beta 12$ -CB(0,1x1).

2.3. Untersuchung des N-terminalen Bereichs der $\alpha 2$ -Kette

2.3.1. Bromcyanpeptide am Aminoende

Die N-terminalen $\alpha 2$ -Peptide konnten zwar aus Gesamtextrakten durch limitierten Bromcyanabbau oder Spaltung bei 30° (nach Denaturierung) isoliert werden, doch war es sowohl am Ionenaustauscher als auch am Molekularsieb äußerst schwierig, andere nichthelikale Peptide und kurze nicht definierte Bruchstücke völlig abzutrennen. Erschwerend kam noch die relativ geringe Absorption dieser $\alpha 2$ -Peptide hinzu. Der Bromcyanabbau wurde deshalb an chromatographisch reiner $\alpha 2$ -Kette durchgeführt.

Wegen der sehr unterschiedlichen Größe der $\alpha 2$ -Peptide war es am günstigsten, diese zuerst am Molekularsieb aufzutrennen. Die $\alpha 2$ -Peptide wurden zunächst an einer Bio-Gel P-2 Säule (100-200 mesh) chromatographiert (Abb. 12).

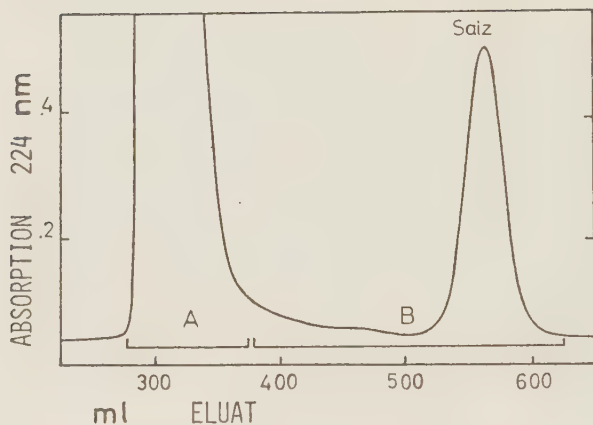


Abb. 12: Chromatographie der $\alpha 2$ -CB-Peptide an Bio-Gel P-2 (100-200 mesh) in 0,1m Essigsäure. Säule: 3,8x38,5cm
Fraktion A und B siehe Text.

Aus Fraktion B wurde durch Rechromatographie an einer dünnen Bio-Gel P-2-Säule (200-400 mesh, höheres Auflösungsvermögen) beim Totalvolumen der Säule $\alpha 2$ -CB0 isoliert, dessen Zusammensetzung Glycin, Leucin, Homoserin lautet. Außerdem enthielt Fraktion B zu einem kleineren Teil $\alpha 2$ -CB1 und $\alpha 2$ -CB1^a (Allysinform- Lysinseitenkette zum Aldehyd oxidiert), wie die weitere Aufarbeitung und Aminosäureanalysen zeigten. Fraktion A wurde an Bio-Gel P-4 aufgetrennt (Abb. 13). Die großen Peptide $\alpha 2$ -CB4 und $\alpha 2$ -CB3,5 eluierten im Ausschlußvolumen und davon gut abgetrennt $\alpha 2$ -CB2. Die zwei flachen Peaks nach etwa dem doppelten Ausschlußvolumen wurden an Phosphocellulose rechromatographiert (Abb. 14). Der erste von beiden erschien kurz nach Beginn des Salzgradienten und enthielt der Aminosäureanalyse zufolge $\alpha 2$ -CB1 (Tabelle 4). Das Peptid $\alpha 2$ -CB1^a (Allysinform) im zweiten Peak, das

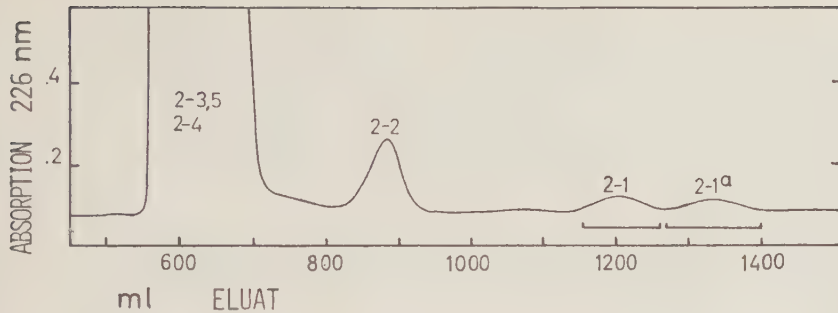


Abb. 13: Rechromatographie der Fraktion A von Abb. 12 an Bio-Gel P-4 unter gleichen Bedingungen wie Abb.11. Bezeichnung: 2-3,5= α 2-CB3,5, 2-4= α 2-CB4 - im übrigen vgl. Abb. 11

wegen seiner geringeren Ladung durch Adsorption später von der Bio-Gel P-4-Säule eluiert wurde, erschien wegen des Ladungseffekts (Lysin umgewandelt) an Phosphocellulose vor α 2-CB1. Zu einem geringen Teil enthielt die

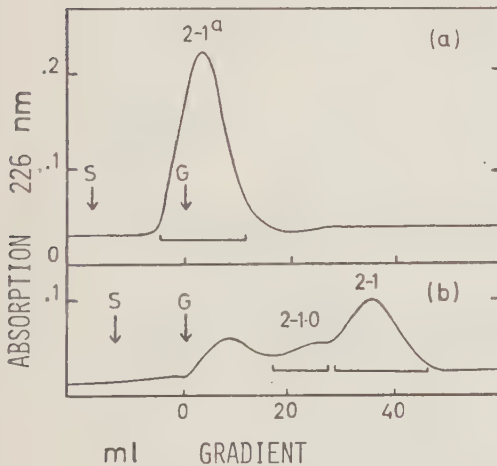


Abb. 14:

Chromatographie der α 2-CB1(b) und α 2-CB1^a-Fraktion(a) von Bio-Gel P-4 an Phosphocellulose mit einem linearen Gradienten von 0-0,45m NaCl über ein Gesamtvolumen von 1000ml. Ubrige Bedingungen wie Abb.16. S=Probe, G=Beginn des Gradienten 2-1-0 = α 2-CB1-0

Vorschulter von α 1-CB1(Abb. 14b) das ungespaltene Peptid α 2-CB1-0. Die lyophilisierten Fraktionen von der Phospho-

cellulosetrennung wurden nochmals an Bio-Gel P-2 chromatographiert, auch hierbei eluierte $\alpha 2$ -CB1-0 in einer Position zwischen den beiden anderen Peptiden.

Die Ergebnisse der Aminosäureanalyse zeigt Tabelle 4.

	$\alpha 2$ -CB1	$\alpha 2$ -CB1 ^a	$\alpha 2$ -CB1 ^x -0
Asp	1,0	1,0	1,1
Hse	0,9	0,9	1,0
Glu	1,2	1,1	1,2
Pro	1,8	1,9	1,7
Gly	3,8	3,9	5,3
Ala	1,0	1,1	1,2
Met	-	-	0,6
Leu	-	-	1,0
Phe	0,9	1,0	1,1
Lys	1,2	-	0,6
Summe	12	11	14,8

xMischung von Lysin-und Allysinform

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung der N-terminalen $\alpha 2$ -CB-Peptide.

Danach unterschied sich $\alpha 2$ -CB1^a von $\alpha 2$ -CB1 nur durch das Fehlen des Lysinrests. Der aus Lysin gebildete Allysinrest im $\alpha 2$ -CB1^a wurde nicht erfaßt, da er unter den Hydrolysebedingungen nicht beständig war. Im Doppelpeptid $\alpha 2$ -CB1-0 war wie zu erwarten Methionin enthalten, weiterhin die Reste von $\alpha 2$ -CB0 und ein Lysinwert von 0,6. Offenbar handelte es sich um eine Mischung der Lysin-und Allysinform.

Da wegen des Auftretens von $\alpha 2$ -CB1-0 die Peptide $\alpha 2$ -CB0 und $\alpha 2$ -CB1 direkt benachbart sein mußten, war die Frage zu klären, welches der beiden Peptide das Aminoende der

$\alpha 2$ -Kette bildet. Das Tripeptid $\alpha 2$ -CB0 war bei der Bromcyanbehandlung der nativen Moleküle im Gegensatz zu $\alpha 2$ -CB1 nicht freigesetzt worden. Da es andererseits aus den verkürzten Komponenten $\alpha 2^{CB}$ und $\beta 12^P$ gewonnen werden konnte, mußte es am Carboxylende von $\alpha 2$ -CB1 liegen.

Weitere Einblicke in die N-terminale Struktur konnten durch enzymatische Spaltung gewonnen werden.

Trypsinspaltung von $\alpha 2$ -CB1

Für die tryptische Spaltung konnte natürlich nur das Lysin enthaltene $\alpha 2$ -CB1 eingesetzt werden, die beiden zu erwartenden Spaltstücke sollten Aufschluß über die Position des Lysins geben. Die abgebaute, auf pH 4 eingestellte Probe wurde auf Bio-Gel P-2 aufgetragen (Abb.15).

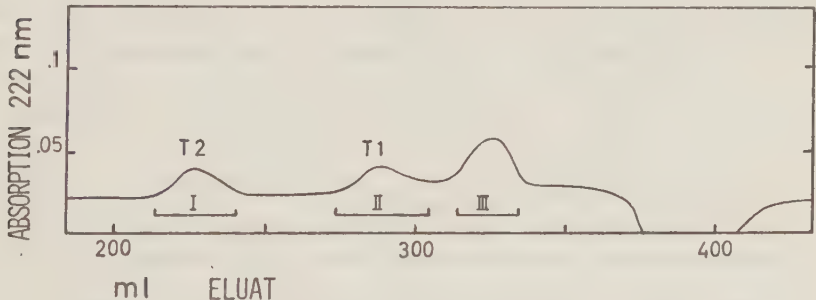


Abb. 15: Trennung der tryptischen Peptide T1 und T2 von $\alpha 2$ -CB1 an Bio-Gel P-2 (200-400 mesh) in 0,1m Essigsäure.
Säule: 3,8x45,5cm

Peak I und II wurden gefriergetrocknet und wie in Abb. 16 gezeigt an Phosphocellulose getrennt. Peak III enthielt ein heterogenes Gemisch kurzer Spaltstücke und wurde nicht weiter untersucht. Die Absorption bei Beginn des Gradienten war Analysen zufolge nicht auf Peptide, sondern offen-

sichtlich auf Spuren von Essigsäure zurückzuführen (Abb.16).

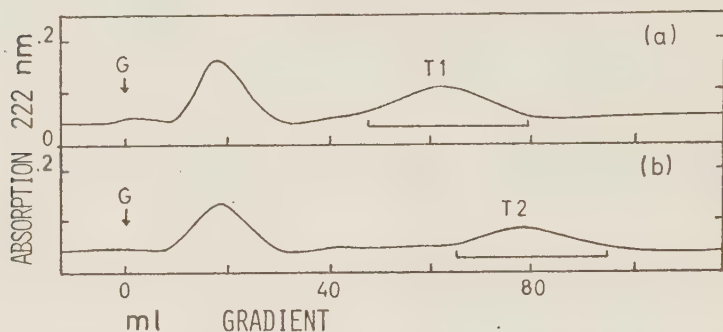


Abb. 16: Chromatographie der Peptide T1(a) und T2(b) von Abb.15 an Phosphocellulose in 0,001m Natriumacetat, pH 3,8 mit einem linearen Gradienten von 0-0,3m NaCl über ein Gesamtvolumen von 500ml bei 40°C. Säule: 1,7x6cm (↓) Beginn des Gradienten

Nach Rechromatographie an Bio-Gel P-2 wurde der Aminosäuregehalt der beiden tryptischen Peptide bestimmt. Das Lysin enthaltende und damit N-terminale Pentapeptid(I) wurde als T1 bezeichnet, das C-terminale Homoserinpeptid(II) T2 (Werte in Tabelle 5).

	$\alpha 2$ -CB1		$\alpha 2$ -CB1 ^a	
	T1	T2	C1	C2
Asp	1,1	-	-	1,0
Hse	-	1,1	-	0,8
Glu	1,1	-	1,0	-
Pro	-	1,9	-	2,1
Gly	-	4,1	-	3,8
Ala	1,0	-	-	1,2
Phe	0,9	-	1,0	-
Lys	1,1	-	-	-
Summe	5	7	2	9

Tabelle 5: Aminosäurezusammensetzung der tryptischen $\alpha 2$ -CB1- und der chymotryptischen $\alpha 2$ -CB1^a-Peptide.

Chymotrypsinspaltung von $\alpha 2$ -CB1^a

Die Chymotrypsinspaltung des $\alpha 2$ -CB1^a lieferte zwei Peptide von sehr unterschiedlicher Größe. Das längere Bruchstück eluierte an Bio-Gel P-2 im Bereich des ungespaltenen Peptids. Das kürzere wurde wie vorher $\alpha 2$ -CB0 aus der Salzregion isoliert, nach Rechromatographie an der gleichen Säule ergab die Aminosäureanalyse die Zusammensetzung Glutamin(-säure), Phenylalanin. Folglich mußte dieses Dipeptid C1 N-terminal sein. Das chymotryptische Peptid C2 erschien an Phosphocellulose mit der Front und wurde anschließend an Bio-Gel P-4 chromatographiert. Die Ergebnisse der Aminosäureanalyse zeigt Tabelle 5.

2.3.2. Sequenzierung

Die beschriebenen Experimente hatten die Bromcyanpeptidfolge 1-0- und weiterhin die Position des Lysinrests im N-terminalen Bereich sichergestellt. Die chymotryptische Spaltung von $\alpha 2$ -CB1^a lieferte das N-terminale C1-Peptid (Glx, Phe). So sollte Glutamin(-säure) das Aminoende der $\alpha 2$ -Kette bilden, gefolgt von Phenylalanin. Da ein "Sequencer" für den automatisierten Edman-Abbau zur Verfügung stand, der auch die Bestimmung an sehr großen Peptiden zuläßt, andererseits aber die Herstellung ausreichender Mengen von $\alpha 2$ -CB1 für die manuelle Methode mit vielen Schwierigkeiten verbunden war, wurde die Sequenzanalyse des N-terminalen Bereichs an ganzen Ketten versucht. An der unveränderten $\alpha 2$ -Kette war dies jedoch nicht möglich, es wurde daraus gefolgert, daß die N-terminale Glutaminsäure zum Imid zyklisiert als Pyrrolidincarbonsäure (PCA= pGlu) vorlag (blockierte α -Aminogruppe). Bekanntlich ist für die einleitende Reaktion des Edman-Abbaus, die Kupplung des Phenylisothiocyans, die freie endständige α -Aminogruppe nötig.

Wurde dagegen ein kurzes Stück vom Aminoende der Kette abgespalten, so war die Sequenzierung ohne weiteres möglich. Bei der durch Pepsin verkürzten α_2^P -Kette führte das zu folgendem Ergebnis (x= nicht identifizierter Schritt):

Asp-Ala-X-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Pro-Met-Gly-Leu-Met-Gly-Pro-Arg-Gly.

Besonderes Merkmal der Sequenz war die kurze Aufeinanderfolge von zwei Methioninresten, Schritt 11-13 mußte daher mit α_2 -CB0 identisch sein. Schritt 4-10 stimmte mit der Zusammensetzung des Peptids T2 und 1-10 mit Peptid C2 überein. Da zur Vervollständigung der N-terminalen Sequenz nur noch das Dipeptid C1 (pGlu-Phe) fehlte, war also die α_2 -Kette durch Pepsin an der gleichen Stelle gespalten worden wie α_2 -CB1 durch Chymotrypsin. Vom Ergebnis des tryptischen Abbaus her (T1) sollte der nicht identifizierbare Schritt 3 ein Lysin enthalten (Rest 5 von α_2 -CB1). Doch lag offensichtlich die α_2^P -Kette größtenteils in der Allylsinform vor, möglicherweise wurde durch die Enzymbehandlung und die vielen Chromatographieschritte diese Form überwiegend herausselektiert. Die an α_2 -CB0 anschließenden Reste in Schritt 14-17 paßten verglichen mit den übrigen α_2 -CB-Peptiden nur zu der Anfangssequenz von α_2 -CB4 [54-55].

Völlig anders fiel die Sequenzanalyse an der α_2^{Pr} -Kette aus. Hier das Resultat:

Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-X-Gly-Ala-X-Gly-Pro-X-Gly-Phe.

Der Vergleich mit α_2 -CB4 [54] zeigte, daß von der ursprünglichen Kette 18 Aminosäuren abgespalten worden waren und daß Glycin in Schritt 1 identisch mit Rest 4 des Peptids war. Somit schloß sich diese Sequenz lückenlos an die in der α_2^P -Kette bestimmte Reihenfolge an.

2.3.3. Diskussion

Die $\alpha 2$ -Kette beginnt am N-Terminus mit dem Peptid $\alpha 2$ -CB1 bzw. $\alpha 2$ -CB1^a. Wie in der $\alpha 1$ -Kette ist die α -Aminogruppe der N-ständigen Glutaminsäure durch Zyklisierung zu PCA blockiert. Das Peptid umfaßt 12 Aminosäurereste, das bedeutet drei bzw. zwei Reste weniger als das entsprechende Peptid von Huhn [56] und Ratte [57], auch ist im Gegensatz dazu bei Kalb weder Tyrosin noch Serin enthalten. Dagegen liegt beim Kaninchen wahrscheinlich die gleiche Aminosäurefolge vor, nur daß dort in $\alpha 2$ -CB1-T1 (s. Abb.17) das Alanin gegen Glycin ausgetauscht ist [58]. Für diese weitgehende Homologie spricht auch, daß man bei Kaninchen zwar eine Immunantwort auf den $\alpha 2$ -CB1-Bereich anderer Spezies, aber nicht von Kalb findet [46].

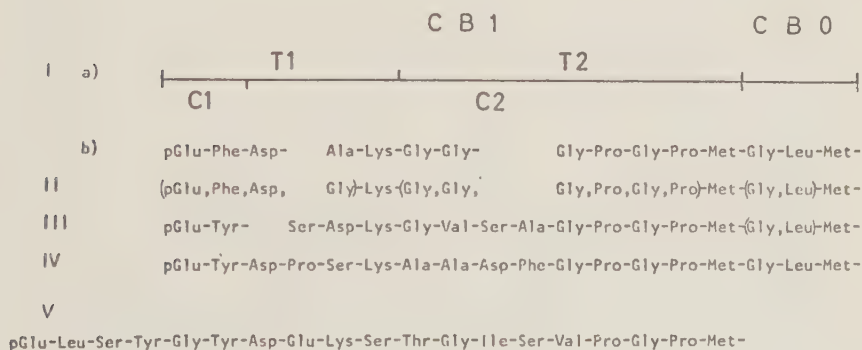


Abb. 17: Speziesunterschiede im N-terminalen Teil der $\alpha 2$ -Kette: I. Kalb: a) Bromcyan-, tryptische, chymotryptische Peptide, b) Sequenz, II. Kaninchen (T1 isoliert) [58], III. Ratte [57], IV. Huhn [56] V. zum Vergleich der $\alpha 1$ -CB1-Abschnitt von Kalb [46]. (Reste in Klammern): Reihenfolge in Analogie zu bekannter Sequenz.

Die bisher bekannten Sequenzen (angegeben in Abb. 17) des N-terminalen Bereichs von Huhn, Ratte und Kalb stimmen in den letzten fünf Resten des $\alpha 2$ -CB1 und im anschließenden Tripeptid $\alpha 2$ -CB0 überein. Übereinstimmung besteht auch zu den letzten vier Resten von $\alpha 1$ -CB1. Vermutlich ist diese Übergangsstelle zur typischen Tripletfolge (-Gly-X-Y-) des helikalen Teils wichtig für die Ausbildung der regulären Konformation des Moleküls und deshalb konstant. Dagegen kann offensichtlich die Position des Lysinrests (der wichtig für die Quervernetzung ist) vom Carboxylende der CB1-Peptide aus gesehen wegen der Flexibilität des Endbereichs variieren.

Bemerkenswert ist in der untersuchten Sequenz die Aufeinanderfolge von drei Glycinresten, im helikalen Teil wurde bisher nur einmal eine Glycyl-Glycin-Bindung in $\alpha 1$ -CB8 gefunden [47] .

2.4. N-terminale Quervernetzung

Die N-terminalen Peptide $\alpha 1$ -CB0,1 und $\alpha 2$ -CB1 enthalten je einen Lysin-bzw. Allysinrest. Wie eingangs berichtet, ist die enzymatische Oxidation zur Allysinform die notwendige Voraussetzung für die Bildung von Quervernetzungen [12,13] .Ein Vergleich der Bromcyanpeptide nach Abbau bei 30° von Neutralsalz-, Citrat-, Essigsäure- und Milchsäureextrakt zeigte bei Essigsäure- eine deutliche Abnahme, bei Milchsäureextrakt ein fast völliges Verschwinden der Lysinformen. Damit korrelierte eine Zunahme der N-terminalen Peptide, die hauptsächlich für die Verknüpfung der $\beta 11$ -und $\beta 12$ -Komponenten verantwortlich sind und auf die nun näher eingegangen werden soll. Um ein übersichtlicheres Bild zu erhalten, wurden die isolierten β -Kompo-

nenten gespalten. Als erstes wurde das Peptid der $\beta 12$ -Komponente, die im löslichen Kollagen insgesamt den Hauptanteil ausmacht, untersucht.

2.4.1. Peptid der $\beta 12$ -Komponente

Die $\beta 12$ -Fraktion der CM-Cellulosetrennung von Citrat- oder Harnstoffextrakt wurde an Bio-Gel A-1,5 von restlichen Monomeren und Polymeren separiert und nochmals an CM-Cellulose chromatographiert. Nach Bromcyanspaltung ließ sich eine effektive Abtrennung des Quervernetzungspeptids von den übrigen CB-Peptiden durch alternierende Chromatographie an Molekularsieb und Ionenaustauscher, Bio-Gel P-4 und Phosphocellulose erreichen. Die Trennung an Bio-Gel P-4 als erster Schritt ermöglichte, wie in Abb. 18 zu sehen ist, eine Abschätzung der Mengenverhältnisse der kleinen Peptide. Vergleicht man das Chromato-

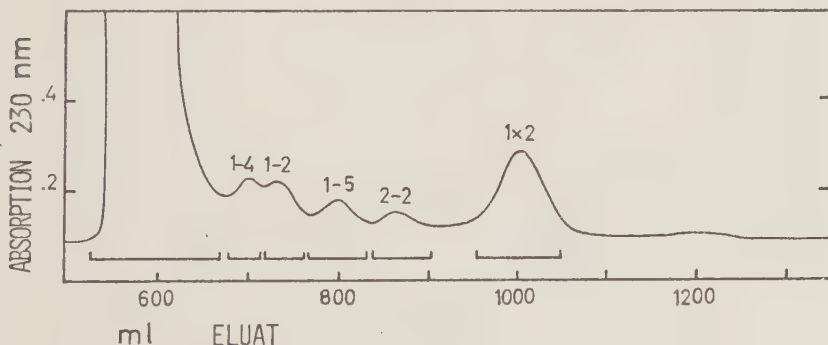


Abb. 18: Chromatographie der CB-Peptide von $\beta 12$ (SLK) an Bio-Gel P-4 unter gleichen Bedingungen wie Abb. 11

Bezeichnung : 1-2= $\alpha 1$ -CB2, 1-4= $\alpha 1$ -CB4, 1-5= $\alpha 1$ -CB5
2-2= $\alpha 2$ -CB2 - im übrigen vgl. Abb. 11

gramm mit dem der N-terminalen Peptide aus dem Dialysat des limitierten Abbaus (Abb. 11), so mußte der letzte

Peak (in Abb. 18) das Quervernetzungspeptid $\beta 12$ -CB(0,1x1) enthalten, wogegen die nichthelikalen Peptide der Einzelketten (Abb. 11, Peak II) nicht vorhanden waren. Die starke Absorption bei 230nm war auf die beiden Tyrosinreste im Peptid (entstammen der $\alpha 1$ -Sequenz) zurückzuführen, die parallele Messung bei 280nm ergab nur an dieser Stelle und beim Ausschlußvolumen einen Peak. Die großen Peptide wurden erwartungsgemäß an der Säule ausgeschlossen, kleinere bis zur Größe von $\alpha 1$ -CB4 (47 Aminosäuren) getrennt. Sie konnten durch Rechromatographie an der gleichen Säule und Phosphocellulose rein dargestellt und anhand ihrer Aminosäurezusammensetzung identifiziert werden. Eine andere Möglichkeit war die Trennung des Abbaugemisches an Phosphocellulose (Abb. 19). Das Quervernetzungspeptid

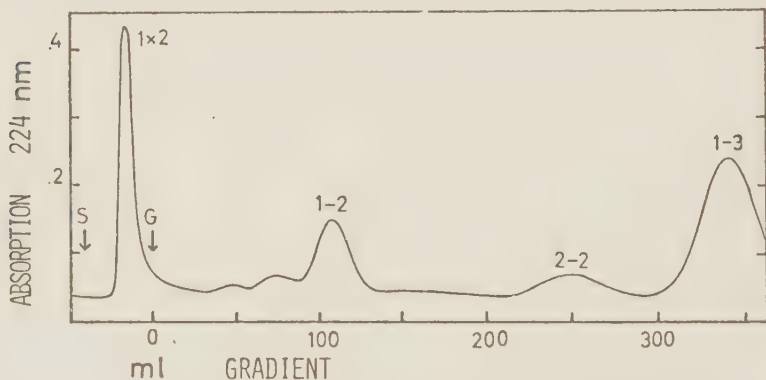


Abb. 19: Chromatographie der CB-Peptide von $\beta 12$ (vgl. Abb. 18) an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie Abb. 16. Bezeichnung: 1-3 = $\alpha 1$ -CB3, - im übrigen vgl. Abb. 18. S=Probe, G=Beginn des Gradienten

erschien an Phosphocellulose mit der Front, war aber noch verhältnismäßig stark mit unspezifischen Spaltstücken und kleineren Peptiden verunreinigt, die meist im Frontpeak bei dieser Säule mit enthalten sind. Die helikalen Peptide

wurden wie oben identifiziert, der etwas verbreiterte $\alpha 2$ -CB2-Peak chromatographierte am Molekularsieb einheitlich.

Um ein reines $\beta 12$ -CB(0,1x1) zu erhalten, wurde die Fraktion von Bio-Gel P-4 je zweimal an der gleichen Säule und an Phosphocellulose chromatographiert. Die Aminosäureanalyse bewies die Identität des Quervernetzungspeptids, zum Vergleich sind in Tabelle (6) die Analysenwerte sämtlicher N-terminaler Peptide zusammengestellt. Die Werte

	$\alpha 1$ -CB0,1 ^a	$\alpha 2$ -CB1 ^a	$\beta 11$ -CB(0,1x0,1)	$\beta 12$ -CB(0,1x1)
Asp	1,1	1,0	2,3	2,1
Thr	0,9	-	1,8	0,9
Ser	2,9	-	5,6	3,0
Hse	0,9	0,9	1,7	1,8
Glu	2,1	1,1	4,1	3,3
Pro	2,0	1,9	3,8	3,7
Gly	3,1	3,9	6,5	6,7
Ala	0,3	1,1	0,6	1,2
Val	1,0	-	2,1	1,1
Ile	1,0	-	1,9	1,0
Leu	1,1	-	1,9	1,1
Tyr	1,9	-	3,7	2,0
Phe	-	1,0	-	1,0
Lys	0,9 ^x	1,2 ^x	-	-
Summe	18(1)	11(1)	36(2)	29(2)

^xWert der entsprechenden Lysinform

(in Klammer): Allylsinreste

Tabelle 6: Aminosäurezusammensetzung der N-terminalen CB-Peptide von $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -Kette und $\beta 11$ -, $\beta 12$ -Komponente.

für $\beta 12$ -CB(0,1x1) zeigten in guter Näherung das Verhältnis ganzer Zahlen. Nur je einmal waren folgende Aminosäurereste

enthalten: Aus $\alpha 1\text{-CB}0,1$ stammten Threonin, Valin, Isoleucin und Leucin, aus $\alpha 2\text{-CB}1$ Alanin und Phenylalanin. Lysinreste erschienen nicht in der Analyse, da sich das Quervernetzungspeptid von den Allysinformen ableitet [17]. Als weiteres Indiz für die Zweikettenstruktur konnten die zwei Homoserinreste gelten.

Nach der Aminosäurezusammensetzung des Peptids wurde ein Molekulargewicht von 2969 berechnet (unter Berücksichtigung von zwei Allysinresten). Wie bereits an Bio-Gel P-4 zeigte $\beta 12\text{-CB}(0,1 \times 1)$ an Sephadex G-50s (Abb. 20) ein von helikalen Peptiden ähnlicher Größe stark abweichendes chromatographisches Verhalten. Das Quervernetzungspeptid eluierte re-

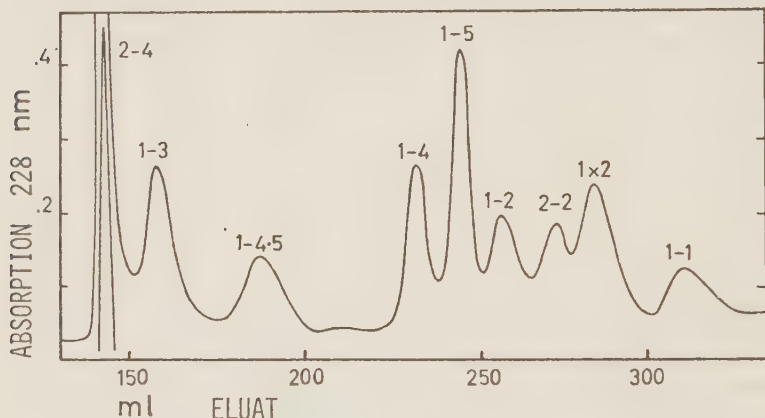


Abb. 20: Trennung eines Kalibrierungsgemisches helikaler CB-Peptide und der Peptide $\beta 12\text{-CB}(0,1 \times 1)$ und $\alpha 1\text{-CB}0,1$ an Sephadex G-50s in 0,03 Natriumacetat, pH 4,8 bei 37°C .
Säule: $2 \times 140\text{cm}$
Bezeichnung: 1-3 = $\alpha 1\text{-CB}3$, 1-4 5 = $\alpha 1\text{-CB}4\text{-}5$, 2-4 = $\alpha 2\text{-CB}4$
- im übrigen vgl. Abb. 11, 18

lativ später von der Molekularsiebsäule. Im Diagramm (Abb. 21) ist das relative Elutionsvolumen (V_E/V_0) der einzelnen Peptide bezogen auf das ausgeschlossene Peptid $\alpha 2\text{-CB}4$ (Molekulargewicht 30000) gegen den Logarithmus des Molekular-

gewichts aufgetragen. Nach Abb. 21 würde die Eichkurve für

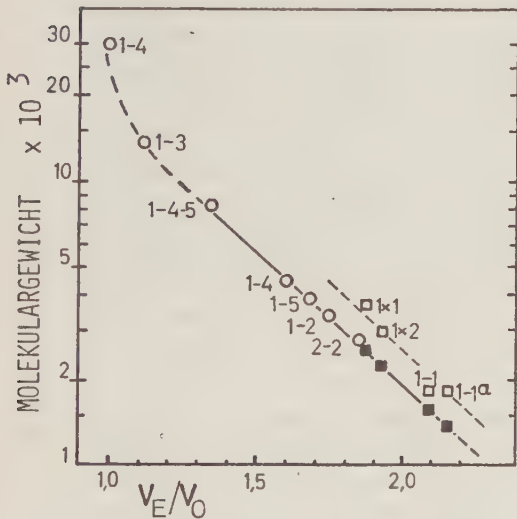


Abb. 21:

Eichkurve nach der Peptidtrennung von Abb. 20. Die Peptide $\beta 11$ -CB(0,1x0,1) und $\alpha 1$ -CB1^a wurden unter identischen Bedingungen chromatographiert. Auftragung von log Mol.-gew. gegen V_E/V_0 . V_E =Elutionsvolumen, V_0 =Ausschlußvolumen. (○) und (■) Mol.-gew. nach Elution, (□) nach Aminosäurezusammensetzung.

Bezeichnung wie Abb. 20

die nichthelikalen Peptide zu niedrige Werte ergeben, für $\beta 12$ -CB(0,1x1) beispielsweise 2250. Die eingefügten Markierungen für die tatsächlichen Molekulargewichte (nach Aminosäuregehalt) liegen ungefähr auf einer zur Eichkurve parallelen Geraden. Diese Feststellung war besonders wichtig zur Charakterisierung von $\beta 11$ -CB(0,1x0,1).

Quantitativ betrachtet, enthielt der Bromcyanabbau von $\beta 12$ die Peptide $\beta 12$ -CB(0,1x1) und $\alpha 1$ -CB2 angenähert in äquimolarem Verhältnis. Die Bestimmung erfolgte nach Bio-Gel P-4-Chromatographie der betreffenden Phosphocellulosepeaks durch Aminosäureanalyse jeweils eines aliquoten Teils (Fehlerbreite 10-20%).

Citratlösliches Kollagen enthielt nach limitierter Pepsinbehandlung unter den angegebenen Bedingungen noch relativ viel $\beta 12$. Die erste pepsinlabile Stelle lag nach der

Sequenz der $\alpha 2$ -Kette zwischen den Resten 2 und 3, das heißt vor der Lysinposition (Rest 5) im $\alpha 2$ -CB1, wo eine Quervernetzung gebildet werden kann. Wegen des verbleibenden hohen $\beta 12$ -Gehalts sollte in den beiden verknüpften Ketten die Spaltung vor der Quervernetzungsstelle am N-Terminus stattgefunden haben. Dies bestätigte die Isolierung eines verkürzten Quervernetzungspeptids $\beta 12^P$ -CB(1x1) unter den gleichen Bedingungen wie beim beschriebenen $\beta 12$ -Peptid. Das chromatographische Bild des Bromcyanabbaugemischs an Bio-Gel P-4 war übereinstimmend, außer daß der Peak, der $\beta 12$ -CB(0,1x1) entsprechen sollte, eine wesentlich geringere Absorption zeigte und geringfügig früher eluierte (der Größe nach müßte das Peptid später eluieren, da aber drei aromatische Seitenreste fehlten, war die Verzögerung durch Adsorption an Bio-Gel P-4 geringer). Die Aminosäurezusammensetzung deutete auf die in Abb. 22 gekennzeichnete Verkürzung um die Reste 1-6^x der $\alpha 1$ -CB1-Sequenz und 1+2 von $\alpha 2$ -CB1 hin. ^xKang et al. konnten mit Pepsin das aus Rattenhaut isolierte $\alpha 1$ -CB1 an der entsprechenden Stelle spalten [57] .

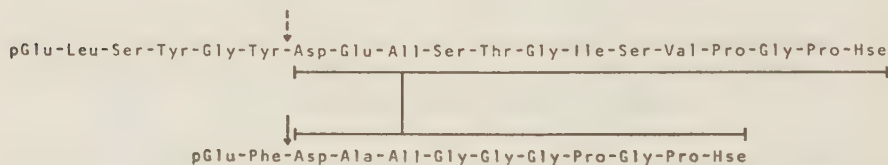


Abb. 22: Mögliche Struktur des verkürzten Peptids $\beta 12^P$ -CB(0,1x1).
 (↓) Pepsin-Spaltstelle, gefunden in der $\alpha 2$ -, (↓) angenommen in der $\alpha 1$ -Kette.
 Al1-Al1=Allysin-Aldol-Quervernetzung

2.4.2. Peptid der β 11-Komponente

Da im löslichen Kalbshautkollagen das β 11-Dimere in wesentlich geringeren Mengen vorlag als β 12 und außerdem an CM-Cellulose mit der zweiten Hälfte des α 1-Peaks eluierte, war die Reindarstellung dementsprechend schwieriger. Nach zweimaliger Trennung an Bio-Gel A-1,5 und anschließender CM-Cellulosechromatographie war in der β 11-Präparation nach Diskelektrophorese α 1 nur noch in Spuren enthalten. Bromcyanspaltung und Peptidtrennung wurden wie bei der β 12-Komponente durchgeführt.

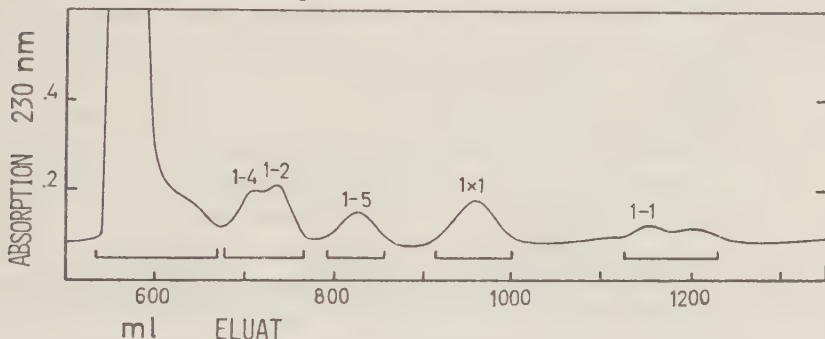


Abb. 23: Chromatographie der CB-Peptide von β 11(SLK) an Bio-Gel P-4 unter gleichen Bedingungen wie Abb. 11.
Bezeichnung vgl. Abb. 11,18

Das Quervernetzungspeptid β 11-CB(0,1x0,1) eluierte an Bio-Gel P-4 etwas früher als das entsprechende β 12-Peptid, auch fiel der Peak vergleichsweise kleiner aus (Abb. 23, vgl. Abb. 18). In geringer Menge wurde aus dem letzten Doppelpeak α 1-CB0,1 und α 1-CB0,1^a isoliert (α 1 im Ausgangsmaterial). Die Position der helikalen α 1-Peptide stimmte mit dem Chromatogramm des β 12-Abbaugemischs überein.

An Phosphocellulose (Abb. 24) chromatographierte β 11-CB(0,1x0,1) ebenfalls im Frontpeak, der Vergleich zu den α 1-Peptiden zeigte bei β 11 in der α 1-CB0,1-Position praktisch keine

Absorption. Zur Isolierung von reinem $\beta 11$ -CB(0,1x0,1) wurde

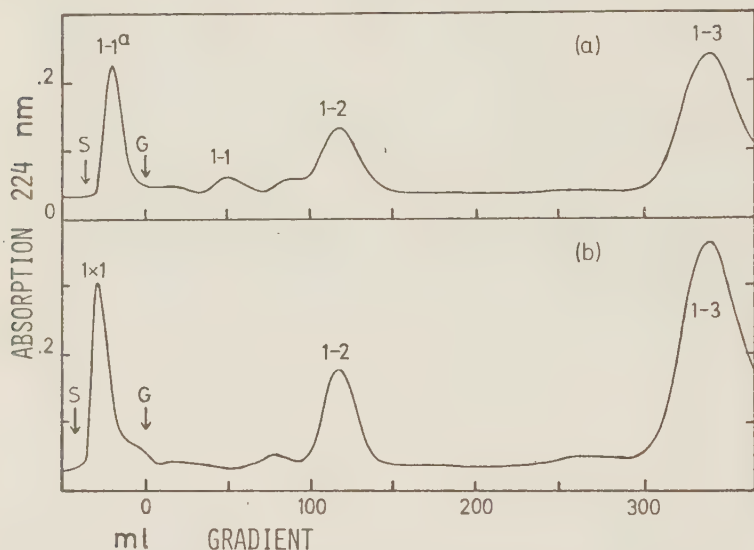


Abb. 24: Chromatographie der CB-Peptide von $\alpha 1$ (a) und von $\beta 11$ (b) an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie Abb. 16. Bezeichnung vgl. Abb. 11, 18, 19

wie beim $\beta 12$ -Peptid die Fraktion von Bio-Gel P-4 alternierend an der gleichen Säule und an Phosphocellulose chromatographiert. Die Aminosäurezusammensetzung wurde bereits in Tabelle 6 angegeben. Im Gegensatz zum $\beta 12$ -Peptid konnte von den Aminosäurewerten her nicht auf eine Zweikettenstruktur geschlossen werden (zwei identische Peptidketten beteiligt). Sie ergab sich jedoch aus dem analogen Elutionsverhalten am Molekularsieb (vgl. $\beta 12$ -CB(0,1x1) und Diskussion). Die Eichkurve helikaler Peptide von Sephadex G-50s lieferte auch hier den zu niedrigen Wert 2550 (Abb. 21), das Molekulargewicht errechnet aus der Aminosäurezusammensetzung betrug 3674.

2.4.3. Diskussion

Beide Quervernetzungspeptide entsprachen nach der Aminosäurezusammensetzung der Summe der kovalent verbundenen Einzelpeptide (Allysinformen). Das von den helikalen Kollagenpeptiden abweichende Verhalten am Molekularsieb war auch bei den Peptiden $\alpha 1$ -CB0,1 und $\alpha 2$ -CB1 zu beobachten. Die Chromatographie helikaler Peptide am Molekularsieb wird stark von dem häufigen Auftreten der Iminosäuren Prolin und Hydroxyprolin in der Sequenz und der daraus resultierenden Sperrigkeit beeinflusst. So entsprechen die Elutionsvolumina von Kollagenketten und deren Bruchstücken jeweils etwa sechsmal größeren globulären Proteinen [59]. Unterschiedlichen Iminosäuregehalt machen Furthmayr und Timpl [60] auch für die geringen Differenzen der Wanderungsgeschwindigkeit zwischen helikalen $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Peptiden in der SDS-Diskelektrophorese verantwortlich. Beim Vergleich der Elution von $\beta 12$ -CB(0,1x1), $\beta 11$ -CB(0,1x0,1) und $\alpha 1$ -CB0,1^a ergaben sich zueinander richtige Proportionen, alle drei Peptide lagen ungefähr auf einer Geraden parallel zum Calibrierungsgemisch helikaler Peptide. Bei $\beta 12$ -CB(0,1x1) bestätigte die Aminosäureanalyse mit einem Minimalwert von zwei Homoserinresten im Peptid die Zwei-Kettenstruktur und das postulierte Molekulargewicht.

Die stöchiometrischen Verhältnisse der aus $\beta 12$ gewonnenen Peptide einschließlich $\beta 12$ -CB(0,1x1) ließen darauf schließen, daß im untersuchten Citratextrakt mindestens 80-90% der isolierten $\beta 12$ -Fraktion über den N-Terminus quervernetzt war. Die gleichen quantitativen Aussagen lieferte die Aufarbeitung aus Harnstoffextrakt, die zu identischen Peptiden führte.

Für die Größe der Peptide ungewöhnlich hoch waren die Verluste bei wiederholter Chromatographie in den einzelnen

Schritten. Irreversible Aggregation und Unlöslichwerden waren möglicherweise auf Sekundärreaktionen der Aldoladditionsprodukte zurückzuführen. Bornstein et al. hatten in ihren Experimenten einen α , β -ungesättigten Aldehyd als integralen Bestandteil dieser Quervernetzungspeptide nachgewiesen [17]. Es wird vielfach angenommen, daß diese reaktionsfähige Verbindung in vivo an der Ausbildung komplexerer Strukturen beteiligt ist.

2.5. Quervernetzung über C-terminale Peptide

Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen waren in nativen Lösungen neben Einzelsegmenten fast ausschließlich Zusammenlagerungen über gleiche Enden gefunden worden (A=Ami-
no-, B=Carboxylende). Im Citratextrakt überwogen die Doppelsegmente A-A und B-B, während in Essigsäure- und noch mehr in Milchsäureextrakten zusätzlich längere Bänder gebildet aus höheren, endverknüpften Polymeren auftraten (...-AB-BA-AB-BA-...). Da räumliche Modelle fibrillärer Strukturen nur realisierbar sind, wenn ein Teil der Moleküle zu einem Nachbarn nicht viertelversetzt ist, sondern mit gleichen Enden abschließt, sollte die Zunahme von Zusammenlagerungen über die A- oder B-Enden im elektronenoptischen Bild auf die Bildung intermolekularer Quervernetzungen zurückgehen. In gewissem Widerspruch zu diesem Befund, demzufolge die A-A- und B-B-Verknüpfungen etwa gleich häufig waren, stand das Ergebnis, daß die aus citratlöslichem Kollagen isolierten β 12-Komponenten (die Hauptfraktion in diesem Extrakt) mindestens zu 80-90% über die N-terminalen Bereiche verbunden waren. Allerdings konnte dabei nicht unterschieden werden, inwieweit es sich um intra- oder intermolekulare Bindungen handelte.

Die Komponenten, bei denen gleiche oder verschiedene Ketten über die C-terminalen Peptide α 1-CB6 bzw. α 2-CB3,5 verknüpft waren, sollten durch limitierten Bromcyanabbau

nicht aufgespalten werden. So war unter allen Versuchsbedingungen ein Rest von β -Komponenten und höheren Polymeren festgestellt worden, wobei dieser Anteil in der Reihenfolge Citrat-, Essigsäure-, Milchsäureextrakt zunahm (vgl. Abb. 8 und 9, Tabelle 2).

In Ergänzung zu den N-terminalen Peptiden galten daher die folgenden Experimente der Klärung intra- und intermolekularer Quervernetzungen über C-terminale Peptide. Da $\alpha 2$ -CB_{3,5} als größtest Bromcyanpeptid an Bio-Gel A-1,5 zuerst eluierte, bestand die Aussicht, daß deutlich größere Komponenten beispielsweise eine Kombination von $\alpha 1$ -CB₆ mit $\alpha 2$ -CB_{3,5} am Molekularsieb abgetrennt werden konnten.

2.5.1. Komponenten aus SLK-Extrakten

Als erstes wurde versucht, Quervernetzungspeptide direkt aus dem Bromcyanabbaugemisch verschiedener SLK-Extrakte zu isolieren. Die Trennung der Peptide von Citrat- und Milchsäureextrakt an Bio-Gel A-1,5 ist in Abb. 25 wiedergegeben. Bei allen Aufarbeitungen erschien vor dem $\alpha 2$ -CB_{3,5}-Peak eine Schulter (in Abb. 25 mit Pfeil gekennzeichnet), am stärksten ausgeprägt bei Milchsäureextrakt. Allerdings ergab die Rechromatographie dieser Fraktionen an der gleichen Säule flache, uneinheitliche Peaks. In der Diskelektrophorese waren mehrere Banden zwischen $\alpha 2$ -CB_{3,5} und $\alpha 2$ zu sehen. Diese Art der Isolierung schien daher wenig aussichtsreich.

Erfolgreicher, nicht zuletzt wegen größerer Mengen an Ausgangsmaterial, war die Überprüfung der $\alpha 2$ -CB_{3,5}-Fraktion der CM-Cellulosechromatographie bei pH 3,6. Die Trennung in Citratpuffer-pH 3,6 wurde in größerem Stil zur Separierung der Peptide aus dem Bromcyanabbau-

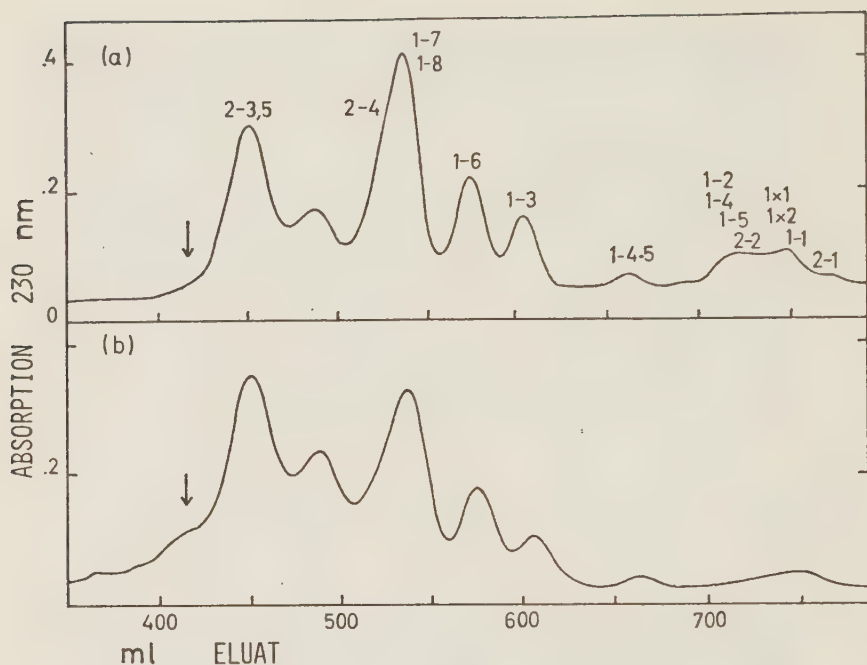


Abb. 25: Chromatographie der CB-Peptide von Citrat-(a) und Milchsäureextrakt (b) ab Bio-Gel A-1,5 unter den in Abb. 1 angegebenen Bedingungen. Säule: 1,5x118cm
Bezeichnung: (↓) siehe Text, 1-8= α 1-CB8, 1-7= α 1-CB7
1-6= α 1-CB6, x=ungespaltene α 1-Peptide - im übrigen vgl. Abb. 13,20.

gemisch von SLK-Extrakten benutzt, α 2-CB3,5 erschien dabei als letzter Peak. Wurde dieser Peak an Bio-Gel A-1,5 chromatographiert, eluierten vor α 2-CB3,5 zwei Fraktionen (A und B) mit höherem Molekulargewicht. Peak A lag zwischen der Position von β und α , Peak B zwischen α und α 2-CB3,5. Die Komponente A lieferte nach Rechromatographie eine einheitliche Bande in der SDS-Diskelektrophorese mit einem Molekulargewicht von 120 000 (Abb. 27). Die Bestimmung an Bio-Gel A-1,5 ergab einen Wert von 110-115 000. Molekulargewicht und Isolierung (aus α 2-CB3,5-Peak von CM-Cellulose) dieser Komponente ließen ein Quervernetzungspeptid β 22-CB(3,5x3,5) vermuten. Diese Annahme

wurde durch die Aminosäureanalyse bestärkt, die Werte stimmten gut mit der theoretisch erwarteten Aminosäurezusammensetzung überein (Tabelle 7), wenn man den bei dieser Peptidgröße zu erwartenden experimentellen Fehler berücksichtigt.

	$\beta 22\text{-CB}(3,5 \times 3,5)^{\times}$	Komponente A	$\beta 12\text{-CB}(6 \times 3,5)^{\times}$	Komponente B
Hyp	102	106	67	70
Asp	70	69	45	47
Thr	24	22	16	17
Ser	38	39	30	28
Hse	-	-	-	(1,3)
Glu	104	97	67	61
Pro	158	163	113	105
Gly	434	429	285	293
Ala	128	143	86	92
Val	38	42	22	23
Met	-	-	-	(0,7)
Ile	24	25	15	13
Leu	42	39	26	25
Tyr	4,2	2,7	3,7	2
Phe	18	17	11	12
Hyl	15	11	9,1	7
His	13	10	7,9	6,8
Lys	28	29	18	19
Arg	72	69	48	49
Summe	1312	1312	870	870

$\times$ Summe der experimentell ermittelten Werte der Einzelpeptide.

Tabelle 7: Aminosäurezusammensetzung der Quervernetzungs-komponenten A und B.

Ein endgültiger Beweis für die Identität der Komponente A mit $\beta 22\text{-CB}(3,5 \times 3,5)$ war nur von der Präparation eines entsprechenden tryptischen oder chymotryptischen Quervernetzungspeptids zu erwarten. Jedoch waren dazu wesentliche Voraussetzungen wie eine höhere Ausbeute an Komponente A und bessere Kenntnis des C-terminalen Bereichs von $\alpha 2\text{-CB}_3,5$ nicht gegeben.

Die zweite Komponente B eluierte bei nochmaliger Chromatographie am Molekularsieb als symetrischer Peak. Die gleiche Fraktion mit einem Molekulargewicht zwischen 70-90 000 konnte mit etwas besserer Ausbeute im nächsten Experiment aus einem $\beta 12$ -Abbau gewonnen werden, eine Beschreibung folgt daher anschließend.

2.5.2. Untersuchung der $\beta 12$ -Fraktion

Vorausgesetzt ein Teil der $\beta 12$ -Komponenten in SLK war über $\alpha 1\text{-CB}_6$ und $\alpha 2\text{-CB}_3,5$ vernetzt, so sollte sich dabei ein einfacheres Bild als bei den Gesamtextrakten ergeben. Deshalb wurden die Bromcyanpeptide der $\beta 12$ -Fraktion von CM-Cellulose (Trennung des Citratextrakts) an Bio-Gel A-1,5 getrennt. Die Fraktion vor $\alpha 2\text{-CB}_3,5$ der Elution nach identisch mit Komponente B, wurde zweimal im gleichen System rechromatographiert (Abb. 26), für den resultierenden symetrischen Peak wurde dabei ein Molekulargewicht von 85 000 ermittelt. Wenn man die Ungenauigkeit der Meßmethode und ein möglicherweise etwas verändertes Elutionsverhalten berücksichtigt, konnte die Komponente B das Quervernetzungspeptid $\beta 12\text{-CB}(6 \times 3,5)$ enthalten. Die Überprüfung der Reinheit an SDS-Diskelektrophorese zeigte, daß die isolierte Fraktion noch nicht ganz einheitlich war. Es traten hauptsächlich zwei Banden (B1, B2) auf,

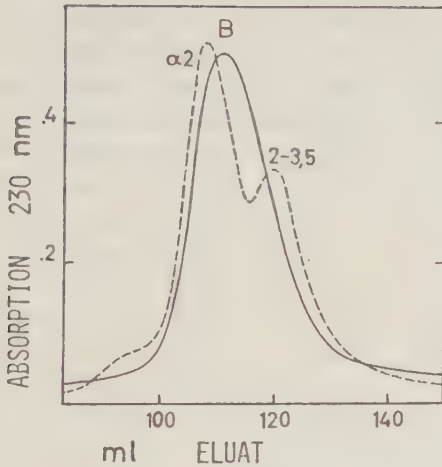


Abb. 26:

Rechromatographie der Fraktion B
(vgl. Abb. 25) an Bio-Gel A-1,5
unter Bedingungen wie Abb. 1.
Säule: 1,5x118cm

unterbrochene Linie=Elution von
 $\alpha 2$ und $\alpha 2$ -CB_{3,5}

ihrer Intensität nach ungefähr im Verhältnis B₁:B₂ wie 1:2.
Für B₁ wurde entsprechend der Laufstrecke im Gel ein Molekulargewicht von 83 000, für B₂ von 72 000 kalkuliert.
Je eine schwache Bande war noch im $\alpha 2$ - und $\alpha 2$ -CB_{3,5}-Bereich vorhanden. Die Eichkurve für die Komponenten A und B₁/B₂ ist in Abb. 27 dargestellt.

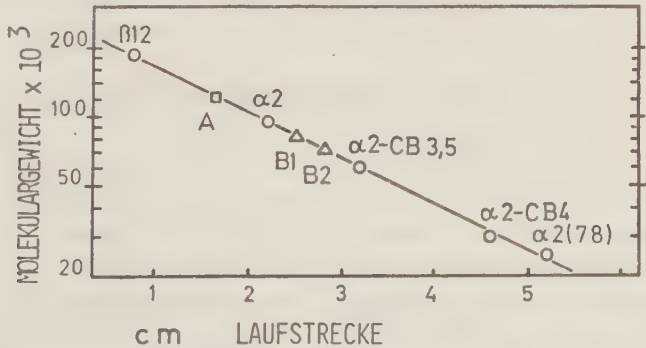


Abb. 27: Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung der Komponenten A und B an SDS-Diskelektrophorese. B liefert die Banden B₁ und B₂. Auftragung von log Mol-gew. gegen Laufstrecke[cm].

Wegen der sehr ähnlichen Ladung und niedriger Ausbeute war eine Abtrennung der Begleitkomponenten an CM-Cellulose (pH 4,8) nicht möglich. In einem immunologischen Test (passiver Hämagglutination-Inhibitionstest, R. Timpl), wurde volle Aktivität sowohl für $\alpha 1$ -CB6^a (unverkürzt [40]) als auch $\alpha 2$ -CB3,5 gefunden [61, 62]. Auch die Aminosäuresammensetzung (angegeben in Tabelle 7) stimmte bei den meisten Resten befriedigend mit der Summe aus $\alpha 1$ -CB6 und $\alpha 2$ -CB3,5 überein, besonders gut bei den apolaren Aminosäuren Valin, Isoleucin, Leucin und Phenylalanin, deren Gehalt in $\alpha 1$ und $\alpha 2$ beträchtlich differiert. Der zu niedrige Tyrosingehalt ließ sich damit erklären, daß die beiden C-terminalen Tyrosinreste fehlen konnten (gefunden beim verkürzten $\alpha 1$ -CB6^b [40]). Wie Hydroxylisin (bzw. der abgeleitete Aldehyd), konnte möglicherweise auch Histidin in eine Quervernetzung integriert sein [63]. In einem $\beta 12$ -CB(6x3,5) wurde andererseits nach vorliegenden Resultaten weder Methionin noch Homoserin erwartet, doch war der Gehalt von etwa je einem Rest zumindest teilweise auf Kontaminierung mit ungespaltenen Peptiden zurückzuführen. Die gewonnenen Daten machten trotz einiger Vorbehalte die Existenz von $\beta 12$ -CB(6x3,5) sehr wahrscheinlich.

2.5.3. Nachspaltung der Komponenten vom limitierten Bromcyanabbau

Ausgehend von der Arbeitshypothese, daß durch Abspaltung des N-terminalen Bereichs auch bei nicht quantitativer Reaktion andere Quervernetzungstypen angereichert werden müßten, wurde an der $\beta 12$ ^{CB}-Komponente obiger Versuch wiederholt. Die $\beta 12$ ^{CB}-Komponente wurde gewählt, da im Gegensatz zu proteolytischem Abbau bei der nativen Bromcyan-spaltung

keine abbaubedingten Veränderungen im C-terminalen Bereich zu erwarten waren. Die an Bio-Gel A-1,5 gereinigten $\beta 12^{CB}$ -Fraktionen verschiedener SLK-Extrakte (60-70 Stunden nativ mit Bromcyan inkubiert) wurden gespalten und aufgetrennt. Die resultierenden Peptide zeigten ein gegenüber normalen $\beta 12$ -Peptiden völlig verändertes Bild bei der Chromatographie an Bio-Gel A-1,5 (siehe Abb. 28). Die Proportionen

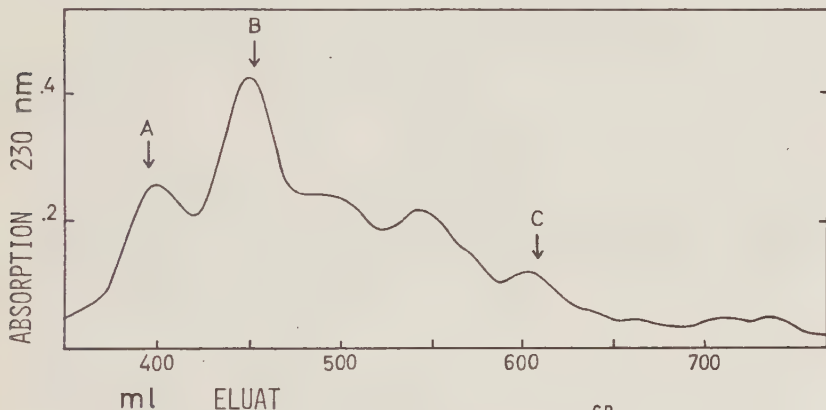


Abb. 28: Chromatographie der CB-Peptide von $\beta 12^{CB}$ (aus Essigsäureextrakt, 60h BrCN 15° -Inkubation) an Bio-Gel A-1,5 unter den Bedingungen wie in Abb. 1. Säulendimensionen wie Abb. 25.
 V_E der Testsubstanzen markiert: A= α -Kette, B= $\alpha 2$ -CB3,5, C= $\alpha 1$ -CB3.

waren stark zum höhermolekularen Bereich hin verschoben. Die Spaltung mußte folglich sehr unvollständig verlaufen sein. Die gleiche Aussage erbrachte die Trennung der kleineren Peptide an Bio-Gel P-4 und Phosphocellulose. An Einzelpeptiden wurde jedoch $\alpha 1$ -CB2 in der erwarteten Größenordnung gefunden, die Beeinträchtigung der Spaltungsreaktion war demnach unterschiedlich. Die Isolierung von etwas $\beta 12$ -CB(0,1x1) wies darauf hin, daß die erste Bromcyanspaltung am N-Terminus der eingesetzten $\beta 12^{CB}$ -Fraktion (ca 60h-Abbau) nicht vollständig war.

Um den Reaktionsverlauf zu überprüfen, wurden die verschiedenen α -Ketten der nativen Bromcyanbehandlung ebenfalls mit Bromcyan nachgespalten. Die Chromatographie an Bio-Gel A-1,5 und P-4 sowie Phosphocellulose zeigte ähnlich der $\beta 12^{CB}$ -Komponente ein deutlich verändertes Peptidmuster, am Molekularsieb in erster Linie die Zunahme höhermolekularer Peptide. Vor allem von $\alpha 1-CB4$, $\alpha 1-CB5$, $\alpha 1-CB6$ und $\alpha 2-CB2$ konnten nur sehr geringe Mengen festgestellt werden. Dagegen wurden aufgrund der Aminosäureanalyse ungespaltene Peptide wie $\alpha 1-CB1-2$ (aus N-terminal nicht verkürztem $\alpha 1$), $\alpha 1-CB4-5$ und $\alpha 1-CB3-7-6^b$ ($\alpha 1-CB6^b$ [40]) zu einem beträchtlichen Prozentsatz nachgewiesen.

Ergebnis dieser Untersuchungen war folglich, daß unter nativen Bedingungen (bei 15°) mit Bromcyan behandeltes Kollagen nur noch unvollkommen durch Bromcyanabbau bei 30° nachgespalten wurde. Prinzipiell machte es dabei keinen Unterschied, ob $\beta 12^{CB}$, $\alpha 1^{CB}$ oder $\alpha 2^{CB}$ eingesetzt wurde. Dieser Weg eignete sich deshalb weder zur Selektion der C-terminalen Quervernetzung, noch zur Klärung der Frage, wo die nativ nicht gespaltenen $\beta 12^{CB}$ -Komponenten verknüpft waren. Als Ursache dieser experimentellen Schwierigkeiten war naheliegend, daß während der langen Inkubationszeit bei nativer Spaltung eine Veränderung an einigen Methioninresten (offenbar unterschiedlich, je nach Position) stattgefunden hatte, an denen dann bei der zweiten Spaltung der normale Reaktionsverlauf unmöglich war.

Die Thioäthergruppierung des Methionins ist leicht oxidierbar. Unter drastischen Bedingungen entsteht Methioninsulfon, das bei den Analysen nicht auftrat, wogegen milde Oxidation (möglich bei Hydrolyse oder Trennung der Aminosäuren am Analysator) zu Methioninsulfoxid führt. Mit milden Reduktionsmitteln (2-Mercaptoäthanol, Thiodiglykol) kann die Bildung des Sulfoxids verhindert bzw. größten-

teils rückgängig gemacht werden (Keutmann, Potts [64]). Zur reproduzierbaren Bestimmung der Methioninreste mußte bei der Durchführung der Aminosäureanalysen (siehe experimenteller Teil) mit diesen Zusätzen gearbeitet werden. Es konnte daher in den Hydrolysaten nicht unterschieden werden, welcher Prozentsatz in einer Probe als Methionin bzw. als Sulfoxid vorlag. Methioninsulfoxid konnte andererseits auch bei Verzicht auf Reduktionsmittel nicht bestimmt werden, da es am Analysator zusammen mit Asparginsäure eluiert wurde. Mit dieser Erklärung durchaus vereinbar waren die Ergebnisse der Aminosäureanalysen der α^{CB} - und α^{CB} -Kette, die für Methionin geringfügig erniedrigte Werte zeigte. Einen Beweis für die Richtigkeit dieser Vorstellung, können nur künftige Experimente liefern, wenn es gelingt unter geeigneten Bedingungen durch Reduktion ungespaltene Doppelpeptide dem Bromcyanangriff wieder zugänglich zu machen.

2.5.4. Diskussion

Die Suche nach Quervernetzungen im C-terminalen Bereich führte zu den Komponenten A und B. Für die Existenz des Peptids $\beta 22\text{-CB}(3,5 \times 3,5)$ das aus dem Bromcyanabbaugemisch von SLK isoliert wurde (Komponente A), sprach das Molekulargewicht, die verglichen mit $\alpha 2\text{-CB}_{3,5}$ ähnliche Ladung und die Aminosäureanalyse. Bei dieser Verbindung mußte es sich zwangsläufig wegen der Beteiligung zweier $\alpha 2$ -Ketten um den Bestandteil einer intermolekularen Quervernetzung handeln. Außerdem ging das Peptid vermutlich aus höheren Polymeren hervor, da eine $\beta 22$ -Komponente bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Für ein postuliertes $\beta 12\text{-CB}(6 \times 3,5)$ gab es zwar einige Anhaltspunkte, doch blieben wegen experimenteller Schwierigkeiten bei der Anreicherung der

Komponente B noch Unsicherheiten. Sehr wahrscheinlich stammte auch dieses Peptid aus Polymeren. Es konnte zwar aus einer $\beta 12$ -Fraktion von CM-Cellulose, die noch zum beträchtlichen Teil Polymere enthielt, gewonnen werden, nicht aber aus $\beta 12$ -Komponenten, die an Bio-Gel A-1,5 und nochmals CM-Cellulose gereinigt worden waren. Das Ergebnis des limitierten Bromcyanabbaus von Essigsäure- und besonders Milchsäureextrakt unterstützte indirekt diese Annahme. Abgesehen von dem Anstieg der α -Ketten resultierte ein verhältnismäßig hoher β -Anteil, der offenbar teilweise von ursprünglichen Polymeren herrührte. Eine nähere Charakterisierung entsprechender $\beta 12^{CB}$ -Fraktionen schlug fehl, da die Nachspaltung mit Bromcyan nur unvollständig ablief.

Hinsichtlich einer quantitativen Abschätzung von Quervernetzungs-komponenten täuschten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen sicherlich einen höheren Anteil besonders C-terminaler Kombinationen vor, da bereits ein geringer Prozentsatz mehrfach verknüpfter Moleküle als Kristallkeim bei der ATP-Fällung dienen konnte. Andererseits war beispielsweise bei der Isolierung der N-terminalen Quervernetzungs-peptide nicht auszuschließen, daß auch Artefakte mit erfaßt wurden (Reaktivität der Allysine-Seitenkette).

Neben den untersuchten "end-to-end"-Bindungen, die im löslichen Kollagen hauptsächlich vertreten waren, sollten aber noch andere Quervernetzungen (vor allem in Milchsäureextrakt) existieren, die möglicherweise im Elektronenmikroskop als nur schwach strukturierte Agglomerate sichtbar waren. Anscheinend vollzieht sich bei diesen Verbindungen der Übergang in den unlöslichen Zustand sehr rasch, so daß sie in Extrakten schlecht faßbar sind. In jüngster Zeit wurde am unlöslichen Material bei Verknüpfungen, die eine Viertelversetzung oder $300\text{\AA}$ -Überlappung der Moleküle in der Fi-

brille fixieren ("side-to-side" bzw. "head-to-tail") die Beteiligung der N-terminalen, nichthelikalen Bereiche nachgewiesen. So beschrieb Kang ein $\beta 11$ -CB(0,1x6), das offensichtlich den "head-to.tail"-Typ verkörpert, außerdem nahm er aufgrund seiner Ergebnisse die Integration intramolekularer Quervernetzungen in höhere Aggregate an [22]. Miller isolierte aus Knorpelkollagen, bei dem an beiden Enden mehrere kürzere Bromcyanpeptide auftreten, zwei Quervernetzungspeptide [65] und konnte inzwischen durch Zuordnung der Peptide nachweisen, daß sie für die "head-to-tail"-Bindung verantwortlich sind [66]. In Einklang mit diesen Befunden waren bei der Chromatographie des Bromcyanabbaugemischs von Milchsäureextrakt (Abb. 25) die N-terminalen Peptide und Quervernetzungspeptide stark reduziert, während die Absorption im $\alpha 2$ -CB_{3,5}-Bereich deutlich zugenommen hatte. Wegen der vielen Kombinationsmöglichkeiten und der geringen Größe der N-terminalen Peptide ist allerdings ein Nachweis entsprechender Quervernetzungen auf der Ebene der CB-Peptide außerordentlich schwierig. Letzten Endes wird auch in diesem Punkt, eine genaue Kenntnis der Sequenz vorausgesetzt, nur die Darstellung kürzerer enzymatischer Spaltstücke zum Erfolg führen.

2.6. Fragmentierung des nativen Moleküls mit Kollagenase

Um einen Einblick in die Primärstruktur des helikalen Teils der $\alpha 2$ -Kette zu gewinnen und die am Aminoende begonnene Sequenzierung fortzuführen, mußten entsprechende Bruchstücke hergestellt werden. Die Bromcyanspaltung der $\alpha 2$ -Kette (Kalbshaut [48]) hatte zu drei kleinen Peptiden geführt, die zusammen nur knapp 5% der gesamten Kette ausmachen, und den beiden großen Peptiden $\alpha 2$ -CB₄

mit 321 und $\alpha 2$ -CB3,5 mit etwa 660 Aminosäuren (vgl. Abb.29). Für die Strukturaufklärung ergab sich daraus die Notwendigkeit, nach einer zusätzlichen Methode der Fragmentierung zu suchen.

Eine Möglichkeit über native Molekülfragmente zu Kettenbruchstücken zu gelangen, bietet der limitierte Abbau mit Bakterienkollagenase. Dieses Enzym spaltet spezifisch apolare Sequenzen im Kollagen. Aus dem elektronenmikroskopischen Bild ging in entsprechenden Experimenten hervor, daß bei 4-10°C der Abbau von den Enden her erfolgte und durch polare Bereiche wesentlich verlangsamt oder völlig unterbunden wurde. Vom Carboxylende ausgehend wurde eine Stoppstelle nach etwa 300Å (30nm) festgestellt, während die Verkürzung vom Aminoende her schrittweise weiter ablaufen konnte. So waren durch Unterbrechung der Inkubation Zwischenstufen definierter Länge faßbar. Stark et al. erhielten mit dieser Modifizierung des Abbaus sechs native Molekülfragmente aus Kalbshautkollagen [67]. Nach grober Vortrennung der nativen Molekülfragmente durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und Denaturierung der Fraktionen gelang es, verschiedene $\alpha 1$ -und $\alpha 2$ -Kettenspaltstücke an CM-Cellulose aufzutrennen (Stark, von der Mark[67,68]). Für die Sequenzierung der Bromcyanpeptide $\alpha 1$ -CB3, $\alpha 1$ -CB7 und $\alpha 1$ -CB6 bedeutete die Überlappung der Bromcyanspaltstellen mit den Kollagenasepeptiden $\alpha 1(125)$, $\alpha 1(105)$ und $\alpha 1(78)$ eine wesentliche Hilfe [68]. Bild 29 veranschaulicht die Überlappung von Bromcyan- und Kollagenasepeptiden. In der $\alpha 2$ -Kette ist der Gewinn durch die neu gebildeten Aminoenden im $\alpha 2$ -CB4- und $\alpha 2$ -CB3,5-Bereich evident, somit war auch für die Bearbeitung der $\alpha 2$ -Struktur die Kollagenasebehandlung erfolgversprechend. Als vorteilhaft war die Vermeidung der zeitraubenden $\alpha 2$ -Isolierung anzusehen. Die Fragmentierung in Peptide mittlerer Größe trug darüber hinaus der veränderten Strategie

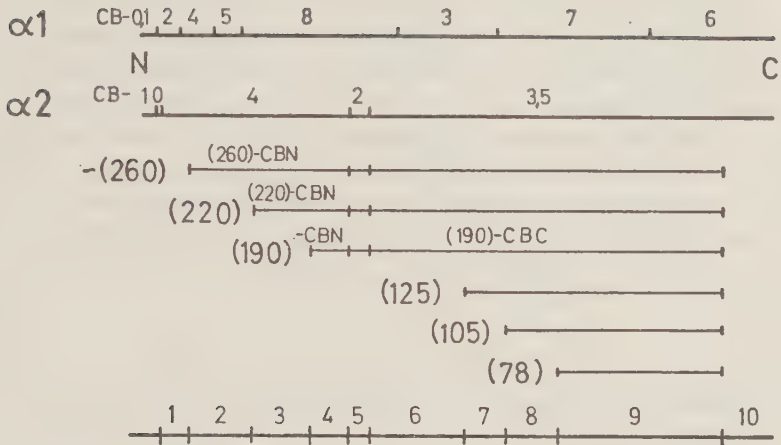


Abb. 29: Schematische Darstellung der CM-Peptide der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette (Kalbshaut) und der $\alpha 2$ -Kollagenasebruchstücke (Länge in nm). Die nummerierten Abschnitte 1-10 (untere Linie) haben die in Tabelle 10 angegebene Aminosäurezusammensetzung, außer (4), (5) siehe Tabelle 9 und (9) Tabelle 8. N=Amino; C=Carboxylende

der automatisierten Sequenzanalyse Rechnung. Mit dieser neuen Technik wird versucht von relativ großen überlappenden Peptiden mit verschiedenen N-Termini zusammenhängende Sequenzen zu erhalten.

2.6.1. Abbau und fraktionierte Fällung

Zur Darstellung der Molekülfragmente wurde citratlösliches Kalbshautkollagen bei 10° , pH 7,0 mit Rohkollagenase etwa 24 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Ansäuern (auf pH 3) gestoppt und die Lösung (bei 4°C) gegen 0,1m Essigsäure dialysiert. Die Molekülfragmente

wurden mit Ammoniumsulfat fraktioniert gefällt, eine Kontrolle der Zusammensetzung in den aufeinander folgenden Fällungen erfolgte in der Diskelektrophorese. Bei etwa 19% Ammoniumsulfatgehalt fielen überwiegend größere Fragmente aus (über 100nm Länge). Nach Erhöhung der Konzentration auf 26% enthielt das Präzipitat fast ausschließlich die 78nm-Fragmente. Eine differenziertere Fraktionierung für analytische Zwecke läßt sich durch engere Abstufung der Salzkonzentration bei der Fällung erzielen.

2.6.2. Separierung der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Bruchstücke

Die Trennung der Kollagenasefragmente in Bruchstücke der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette wurde an CM-Cellulose vorgenommen. Die Chromatographie der Peptide vom 78nm-Fragment (26%-Fällung) war bereits früher beschrieben worden [67], $\alpha 2$ (78) eluierte im letzten von drei ungefähr gleich grossen, gut getrennten Peaks und konnte durch Chromatographie an Bio-Gel A-1,5 rein erhalten werden. Die CM-Cellulosetrennung der Kettenbruchstücke aus dem Präzipitat mit den größeren Fragmenten (19%-Fällung) ist in Abb. 30 wiedergegeben. Die einzelnen Fraktionen von CM-Cellulose wurden in der Diskelektrophorese analysiert. Dies erlaubte eine grobe Klassifizierung nach Molekulargewicht und, da die $\alpha 2$ -Bruchstücke generell etwas schneller wandern als solche gleicher Größe von $\alpha 1$ [67], eine Zuordnung zu Peptiden der $\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Kette. Demzufolge eluierten an CM-Cellulose im Bereich A die $\alpha 1$ - und in B die $\alpha 2$ -Peptide. Der erste Gipfel der Fraktion B enthielt $\alpha 2(105)$ und $\alpha 2(125)$, der zweite $\alpha 2(190)$ und in seiner absteigenden Flanke als Schulter $\alpha 2(220)$ und $\alpha 2(260)$. Die quantitativen Verhältnisse der Komponenten

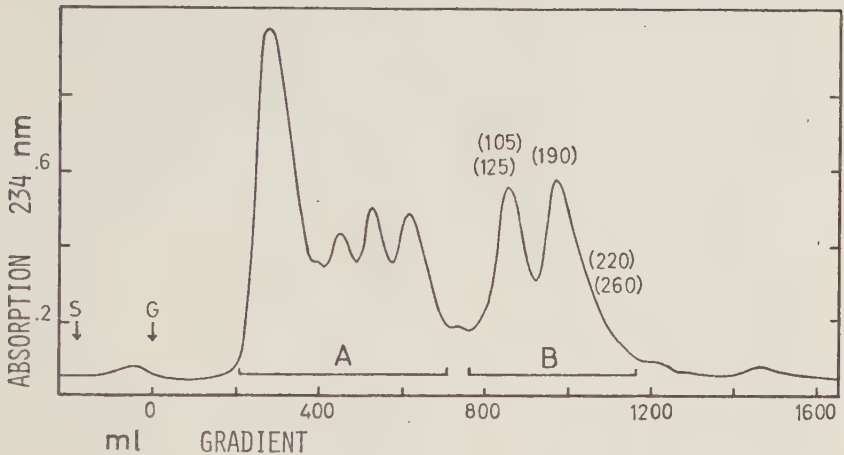


Abb. 30: Trennung der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kollagenasebruchstücke (19%-(NH_4) $_2\text{SO}_4$ -Fällung) an CM-Cellulose. Elution in 0,05m Natriumacetat mit einem linearen Gradienten 0-0,095m NaCl über ein Gesamtvolumen von 2000ml. Übrige Bedingungen wie Abb. 5.
A= $\alpha 1$ -, B= $\alpha 2$ -Bruchstücke (Ziffern=Größe),
S= Probe, G= Beginn des Gradienten

schwankten bei verschiedenen Aufarbeitungen. Die Fällung mit einer geringeren Ammoniumsulfatkonzentration verschob im ersten Präzipitat die Verteilung zugunsten der längeren Kollagenasebruchstücke.

2.6.3. Untersuchung der $\alpha 2$ -Bruchstücke

Die Charakterisierung der einzelnen $\alpha 2$ -Bruchstücke erfolgte durch Molekulargewichtsbestimmung, Aminosäureanalyse (Tabelle 8 und 9) und gegebenenfalls Bromcyanspaltung.

Wie in Abb. 29 schematisch dargestellt, liegen die Aminoenden von $\alpha_2(78)$, $\alpha_2(105)$ und $\alpha_2(125)$ im Peptid $\alpha_2\text{-CB3,5}$. Diese Peptide wurden zunächst untersucht. Das kürzeste Bruchstück $\alpha_2(78)$ war isoliert. Zur Darstellung von $\alpha_2(105)$ und $\alpha_2(125)$ wurde der entsprechende Peak von CM-Cellulose (Abb. 30) an der gleichen Säule mit einem flacheren Gradienten getrennt. Der erste, größere Peak

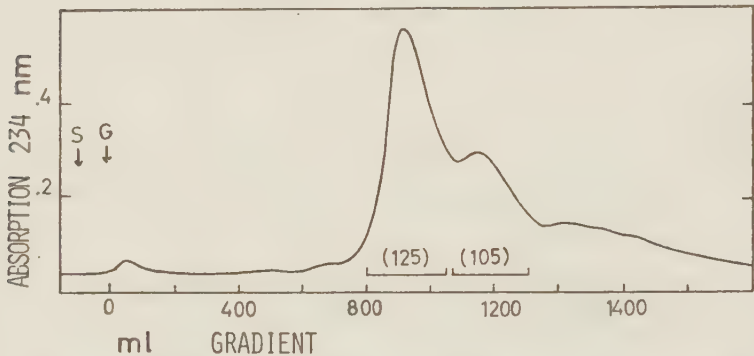


Abb. 31: Trennung der Kollagenasebruchstücke $\alpha_2(125)$ und $\alpha_2(105)$ an CM-Cellulose mit einem linearen 0-0,065m NaCl-Gradienten über ein Gesamtvolumen von 2000ml unter den in Abb. 5 angegebenen Bedingungen.
S= Probe, G= Beginn des Gradienten

mußte der anschließenden Chromatographie an Bio-Gel A-1,5 zufolge das Peptid $\alpha_2(125)$ und der zweite Peak $\alpha_2(105)$ sein.

Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung an Agarose korrelierten mit den im Elektronenmikroskop gemessenen Längen. Es ergaben sich die Molekulargewichte: $\alpha_2(78) = 26000$, $\alpha_2(105) = 33200$ und $\alpha_2(125) = 38900$. Die Aminosäureanalyse der drei Kollagenasepeptide (in Tabelle 8) zeigte in zwei Punkten einen wesentlichen Unterschied zu den gleich großen α_1 -Peptiden. Keine der analysierten Proben enthielt Methionin, dagegen war in allen ein Tyrosinrest enthalten.

	$\alpha 2(78)$	$\alpha 2(105)$	$\alpha 2'(125)$	$\alpha 2(190)$ -CBC	$\alpha 2$ -CB3,5
Hyp	20	24	29	43	51
Asp	16	20	23	30	35
Thr	5,8	6	8	10	12
Ser	7,5	7,6	10	15	19
Glu	21	25	31	39	52
Pro	38	50	53	74	79
Gly	95	118	144	190	217
Ala	27	47	56	63	64
Val	13	16	19	19	19
Ile	2,6	5	6,3	11	12
Leu	7,7	8,4	10	15	21
Tyr	0,9	0,7	1,1	1	2,1
Phe	3,8	3,9	3,6	8,6	9
Hyl	3,3	4,5	4,3	5,1	7,4
His	2,1	1,6	1,8	2	6,3
Lys	5,2	5,7	7,6	11	13,7
Arg	16	22	26	33	36
Summe	285	365	433	570	655

Tabelle 8: Aminosäurezusammensetzung der kurzen $\alpha 2$ -Kollagenasebruchstücke und des gemeinsamen C-terminalen BrCN-Peptids $\alpha 2(190)$ -CBC der längeren Bruchstücke.

Die Bruchstücke $\alpha 2(190)$, $\alpha 2(220)$ und $\alpha 2(260)$ mußten ihrer Größe nach das Carboxylende von $\alpha 2$ -CB4 überlappen (s. Abb.29). Die Fraktion von CM-Cellulose, in der die genannten Peptide enthalten waren (Abb. 30), wurde an Agarose chromatographiert. Dabei konnte $\alpha 2(190)$ gut abgetrennt werden und war nach Rechromatographie an der gleichen Säule einheitlich. Dagegen war weder am Molekülsieb noch am Ionenaustauscher eine befriedigende Separierung von $\alpha 2(260)$ und $\alpha 2(220)$ zu errei-

chen. Allerdings war diese Schwierigkeit ohne Bedeutung, da es gelang, die längeren Bruchstücke anhand ihrer Bromcyanpeptide näher zu charakterisieren. Für $\alpha 2(190)$ ergab die Aminosäureanalyse zwei Methioninreste, somit konnten drei Peptide erwartet werden.

2.6.4. Spaltung der Bruchstücke in kürzere Peptide mit Bromcyan

Das Bromcyanabbaugemisch von $\alpha 2(190)$ wurde an Bio-Gel P-10 aufgetrennt (Abb.32).

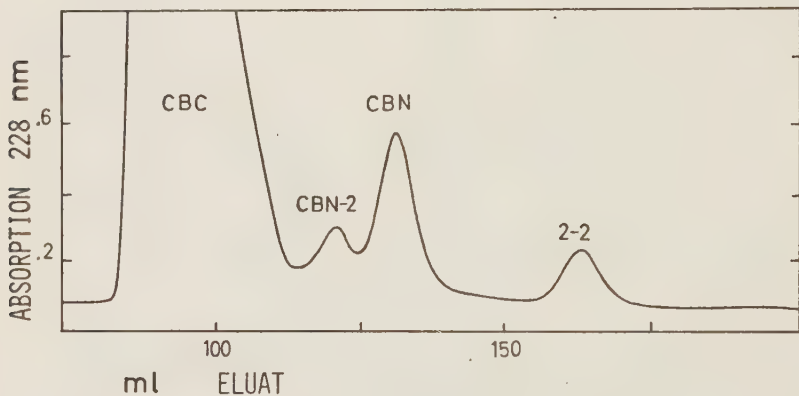


Abb. 32: Chromatographie der CB-Peptide von $\alpha 2(190)$ an Bio-Gel P-10 in 0,03m Natriumacetat, pH 4,8 bei Raumtemperatur.
Säule: 1,5x118cm

Bezeichnung: CBC= $\alpha 2(190)$ -CBC, CBN(-2)= $\alpha 2(190)$ -CBN(-2)
2-2= $\alpha 2$ -CB2

Das kleinste Peptid enthielt Homoserin und war aufgrund des Elutionsvolumens und der Aminosäureanalyse identisch mit $\alpha 2$ -CB2. Das nächstgrößere, ebenfalls ein Homoserinpeptid, war folglich als C-terminales Bruchstück von $\alpha 2$ -CB4 anzusehen und wurde als $\alpha 2(190)$ -CBN bezeichnet (Tabelle 9). Eine

nicht gespaltene Komponente aus diesen beiden Peptiden, ein $\alpha 2(190)$ -CBN-2, eluierte kurz davor und enthielt neben einem Homoserin einen Methioninrest. Der dominierende Peak am Ausschlußvolumen von Bio-Gel P-10 wurde an Bio-Gel A-1,5 und Phosphocellulose gereinigt und mußte, da in der Analyse weder Homoserin noch Methionin gefunden wurde, das carboxyl-endständige $\alpha 2(190)$ -CBC repräsentieren (Tabelle 8).

Das Abbaugemisch der Bruchstücke $\alpha 2(260)/\alpha 2(220)$ sollte wie bei $\alpha 2(190)$ ebenfalls die Peptide $\alpha 2$ -CB2 und $\alpha 2(190)$ -CBC enthalten (vgl. Schema in Abb. 29). Dies bestätigte die Untersuchung der Fraktionen von Bio-Gel A-1,5 (Abb. 33).

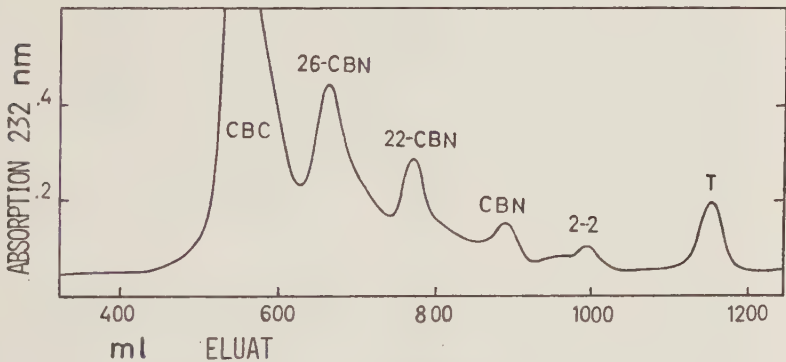


Abb. 33: Chromatographie der CB-Peptide der Fraktion $\alpha 2(260)/\alpha 2(220)$ an Bio-Gel A-1,5 unter den in Abb. 1 angegebenen Bedingungen. Säule: 3x144cm

Bezeichnung: (26)-CBN= $\alpha 2(260)$ -CBN, (22)-CBN= $\alpha 2(220)$ -CBN

T= Tyrosin (Marker) CBC, CBN, 2-2 vgl. Abb.32

Der erste Peak an Bio-Gel A-1,5 entsprach nach Molekulargewicht, Elutionsverhalten an Phosphocellulose und Aminosäureanalyse dem $\alpha 2(190)$ -CBC. Ebenso war das kleinste Peptid $\alpha 2$ -CB2. Die Peptide im zweiten und dritten Peak waren nach Chromatographie an Phosphocellulose und nochmals Bio-Gel A-1,5 einheitlich und enthielten jeweils ein

Homoserin, mußten daher wieder Teile von $\alpha 2$ -CB₄ sein. Anhand dieser aminoendständigen Peptide $\alpha 2(260)$ -CBN und $\alpha 2(220)$ -CBN konnten also die Kollagenasebruchstücke $\alpha 2(260)$ und $\alpha 2(220)$ unterschieden werden (Tabelle 9). Zwischen $\alpha 2(220)$ -CBN und $\alpha 2$ -CB₂ eluierte noch in geringerer Menge $\alpha 2(190)$ -CBN, das Ausgangsgemisch enthielt demnach auch etwas $\alpha 2(190)$.

	$\alpha 2(190)$ -CBN	$\alpha 2(220)$ -CBN	$\alpha 2(260)$ -CBN	$\alpha 2$ -CB ₄	$\alpha 2$ -CB ₂
Hyp	4,2	11	22	30	2,2
Asp	3,1	8,1	12	12	1,8
Thr	0,9	1,9	4,8	5,4	1,0
Ser	3,5	4,7	10	11	1,8
Hse	0,9	0,8	1,1	1,0	1,0
Glu	6,8	16	19	24	1,2
Pro	5,3	19	28	35	3,1
Gly	23	54	91	106	10
Ala	4,7	22	32	36	2,7
Val	2,7	3,9	12	12	1,0
Ile	1,1	1,8	4,3	4,1	-
Leu	2,0	5,2	11	12	1,2
Phe	-	1,3	2,8	4,0	-
Hyl	-	0,2	2,6	3,8	-
His	-	0,4	1,3	1,7	-
Lys	2,2	3,3	5,8	5,5	-
Arg	4,1	6,7	15	17	3,1
Summe	65	160	275	321	30

Tabelle9: Aminosäurezusammensetzung der N-terminalen BrCN-Peptidbruchstücke von $\alpha 2(190)$, $\alpha 2(220)$ und $\alpha 2(260)$, im rechten Teil der Tabelle $\alpha 2$ -CB₄ und das daran anschließende $\alpha 2$ -CB₂.

2.6.5. Diskussion

In der Übersichtsdarstellung (Abb. 29) kommt zum Ausdruck, daß durch limitierte Kollagenasespaltung und anschließenden Bromcyanabbau besonders im $\alpha 2$ -CB₄-Bereich günstige Voraussetzungen für den schrittweisen Edman-Abbau im Sequencer geschaffen werden. Man erhält weitere drei Aminoenden in gestaffelter Anordnung, so daß eine, wenn auch nicht zusammenhängende, Sequenzbestimmung von über einem Drittel der Reste in $\alpha 2$ -CB₄ durchaus realistisch erscheint. Eine gute Ergänzung hierzu sollte die erleichterte Zuordnung der Peptide nach Enzymspaltung der verschiedenen CBN-Bruchstücke sein. Nicht ganz so günstig sind die Verhältnisse im $\alpha 2$ -CB_{3,5}, wo man immerhin im Mittelteil drei neue N-Termini erhält. Im ersten Viertel und vor allem in der zweiten Hälfte des Peptids, die fast völlig von $\alpha 2(78)$ eingenommen wird, ist jedoch jeweils ein längerer Abschnitt der direkten Sequenzierung nicht zugänglich.

Der diskontinuierliche Aufbau der Kette, das heißt die unterschiedliche Häufung bestimmter Aminosäuren in verschiedenen Bereichen, ist ein wichtiger Gesichtspunkt bei der Spaltung mit Enzymen wie Chymotrypsin, Trypsin oder Thermolysin. Auch ist die Differenzierung in charakteristische Bereiche von Bedeutung für die Steuerung der Fibrillenbildung. Hierbei spielen vor allem Wechselwirkungen eine Rolle, die von hydrophoben und andererseits von geladenen oder polaren Seitengruppen ausgehen [9-11]. So wurde, um hierfür Anhaltspunkte zu erlangen, die Kette rein rechnerisch in zehn Abschnitte durch Differenz der Analysenwerte entsprechender Bruchstücke unterteilt (unter Vernachlässigung des Aminoendes). Die Aminosäurezusammensetzung dieser in Abb. 29 dargestellten

Tabelle 10: Aminosäurezusammensetzung der in Abb. 24 aufgeführten Bereiche, Abschnitt (4), (5) und (9) s. Tab. 9 bzw. 8

	(1)	(2)	(3)	(6)	(7)	(8)	(10)
	$\alpha 2$ -CB4	$\alpha 2$ (260)-CBN	$\alpha 2$ (220)-CBN	$\alpha 2$ (190)-CBC	$\alpha 2$ (125)	$\alpha 2$ (105)	$\alpha 2$ -CB3,5
	$-\alpha 2$ (260)-CBN	$-\alpha 2$ (220)-CBN	$-\alpha 2$ (190)-CBN	$-\alpha 2$ (125)	$-\alpha 2$ (105)	$-\alpha 2$ (78)	$-\alpha 2$ (190)-CBC
Hyp	8	11	6,8	14	5	4	8
Asp	-	3,9	5,0	7	3	4	5
Thr	0,6	2,9	1,0	2	2	-	2
Ser	1,0	5,3	1,2	5	2,4	-	4
Glu	5	3	9,2	8	6	4	13
Pro	7	9	14	21	3	12	5
Gly	15	37	31	46	26	23	27
Ala	4	10	17	7	9	20	1
Val	-	8,1	1,2	-	3	3	-
Ile	-	2,5	0,7	4,7	1,3	2,4	1
Leu	1	5,8	3,2	5	1,6	0,7	6
Tyr	-	-	-	-	0,4	-	1,1
Phe	1,2	1,5	1,3	5	-	-	0,4
HyI	1,2	2,4	0,2	0,8	-	1,2	2,3
His	0,4	0,9	0,4	-	-	-	4,3
Lys	-	2,5	1,1	3,4	1,9	0,5	2,7
Arg	2	8,3	2,6	7	4	6	3
Summe	46	114	96	136	69	81	86

Einheiten ist in Tabelle 10 angegeben (soweit nicht bereits in Tabelle 8 und 9 enthalten). Natürlich ist diese Einteilung für einen Vergleich der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette noch sehr grob, auch birgt die Methode selbst manche Fehlermöglichkeit in sich. Einige dieser Bereiche sollen nun kurz beschrieben werden. Beispielsweise ergibt sich Abschnitt (1) aus der Differenz von $\alpha 2$ -CB4 und $\alpha 2(260)$ -CBN, auffallend ist in dieser kurzen Aminosäurefolge die große Zahl an Prolin und Hydroxyprolin. Abschnitt (4)-(5), verkörpert durch $\alpha 2(190)$ -CBN-2, ist relativ polar, während (6), das erste Viertel von $\alpha 2$ -CB3,5 durch einen höheren Iminosäuregehalt und je fünf der ausgesprochen hydrophoben Reste Isoleucin, Leucin, Phenylalanin wiederum mehr apolaren Charakter besitzt. Das erklärt auch, warum das nächste Kollagenasepeptid $\alpha 2(125)$ erst nach 136 Resten beginnt. In Abschnitt (8) ist der überdurchschnittliche Gehalt an der neutralen Aminosäure Alanin bemerkenswert. Das anschließende $\alpha 2(78)$ -Bruchstück (=9) hat eine ähnliche Zusammensetzung wie die Region bei $\alpha 2$ -CB4, jedenfalls muß dieser längste, nicht weiter aufgegliederte Bereich mit einer ziemlich polaren Zone abschließen. Diese allen Fragmenten gemeinsame C-terminale Kollagenase-Stoppstelle ist im Elektronenmikroskop als markanter Querstreifen sichtbar. Am letzten Abschnitt (10), der allen Kollagenasebruchstücken fehlt, sind viele polare Reste aber auch sechs Leucin und ein hoher Iminosäureanteil beteiligt. Wie in der $\alpha 1$ -Kette scheint auch für die Endbereiche des helikalen Teils von $\alpha 2$ ein überdurchschnittlicher Gehalt an Prolin und Hydroxyprolin typisch zu sein, der die Stabilität der tripelhelikalen Struktur erhöht.

Eine weitere Aufspaltung der Polypeptidkette zum Beispiel mit Chymotrypsin wird vom Auftreten hauptsächlich von Phenylalanin, Tyrosin und daneben auch Leucin be-

stimmt, bei der Trypsinspaltung vom Gehalt an Lysin, Arginin und (mit geringerem Effekt) Hydroxylysin. So ist etwa in Abschnitt (6) mit relativ viel chymotryptischen Peptiden zu rechnen. Dabei muß aber die Einschränkung gemacht werden, daß beide Endopeptidasen eine Aminoacyl-Prolin- oder Hydroxyprolinbindung nicht spalten. Wegen des hohen Iminosäuregehalts und da Phenylalanin bisher nur und Leucin fast ausschließlich in X-Position (-Gly-X-Y-) gefunden wurde, wird man also gerade bei der chymotryptischen Spaltung meist nicht die erwartete Anzahl an Peptiden erhalten.

Seltener vorkommende Aminosäuren sind für die Zuordnung kleinerer Peptide neben Überlappungen ein wichtiger Anhaltspunkt. Während das Tyrosin am Ende der Kette analog zu $\alpha 1$ -CB6 am Beginn des nichthelikalen Teils lokalisiert ist [52], stellt der Rest im $\alpha 2$ (78) insofern eine Besonderheit dar, als hier das einzige Mal Tyrosin im helikalen Teil erscheint. Hydroxylysin tritt bevorzugt in bestimmten Abschnitten nahe den Enden auf. Histidin kommt zu je zwei Resten in $\alpha 2$ -CB4 und $\alpha 2$ (78) vor, die übrigen vier liegen im C-terminalen Abschnitt. Der Gehalt bei der Aminosäuren ist in $\alpha 2$ beträchtlich höher als in der $\alpha 1$ -Kette. Die wesentliche Rolle des Hydroxylysins für die Quervernetzung ist unumstritten, in der $\alpha 1$ -Sequenz wurde an zwei Stellen eine fast identische Struktur mit Histidin in unmittelbarer Nähe des Hydroxylysins gefunden. Etwas Entsprechendes ist auch in der $\alpha 2$ -Kette denkbar, jedenfalls sollte die Verteilung dieser Aminosäuren, vor allem die Konzentration am Carboxylende eine wichtige Funktion erfüllen.

3. ZUSAMMENFASSUNG

Das Einzelmolekül des Kollagentyps, der in Kalbshaut vorherrschend ist, setzt sich aus zwei $\alpha 1$ - und einer $\alpha 2$ -Kette zusammen. Hauptziel dieser Arbeit war, in Ergänzung zur $\alpha 1$ -Kette, an deren Primärstrukturaufklärung im Arbeitskreis Kühn bereits intensiv gearbeitet wurde, entsprechende Untersuchungen an der $\alpha 2$ -Kette einzuleiten. Grundvoraussetzung hierfür war zunächst die Präparation genügender Mengen der $\alpha 2$ -Kette.

Als Ausgangsmaterial diente lösliches Kollagen. Die Extraktion der zerkleinerten Haut (Mittelspalt) mit Neutralsalzpuffer (neutralsalzlösliches Kollagen=NLK) und anschließend im sauren Milieu (säurelösliches Kollagen=SLK) mit sukzessiv stärker quellend wirkenden Lösungsmitteln ergab Lösungen nativer Moleküle mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad. Die Charakterisierung der gelösten Komponenten wurde nach Denaturierung des Kollagens durch Molekularsieb-, CM-Cellulosechromatographie und Disk-elektrophorese vorgenommen. Dabei zeigte sich, daß in NLK überwiegend die monomeren Einzelketten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ angereichert waren. Allerdings könnte bei neutralem pH lediglich ein geringer Teil des Kollagens in Lösung gebracht werden, so daß hieraus insgesamt nur wenig $\alpha 2$ zu gewinnen war. Eine höhere Ausbeute lieferte die saure Extraktion, doch erschwerte der wachsende Gehalt an β -, γ - und höheren Komponenten die Abtrennung der $\alpha 2$ -Kette. Im Citratextrakt stieg zunächst der Prozentsatz der dimeren β -Komponenten, während dadurch die Separierung der $\alpha 1$ -Kette an CM-Cellulose kaum beeinträchtigt wurde (nur geringe Mengen $\beta 11$), da $\alpha 1$ bei dieser zur Ketten-trennung üblichen Chromatographie zuerst eluiert, über-

lagerte die dominierende β 12-Komponente den nachfolgenden α 2-Peak ganz erheblich. Mit der Quellung des Rückstands, die bei Einwirkung der verdünnten Essigsäure verstärkt einsetzte, nahm dann der Gehalt an γ - und höheren Komponenten deutlich zu, im Milchsäureextrakt überwog er schließlich Mono- und Dimere. Ähnlich wie bei SLK war das Lösungsverhalten bei wiederholter Extraktion mit (denaturierend wirkender) 8m Harnstofflösung, bei längerer Harnstoffeinwirkung war auch hier ein Anstieg der Polymeren festzustellen.

Eine Möglichkeit, den Engpaß in der α 2-Herstellung zu umgehen, bot der limitierte Abbau des nativen SLK mit proteolytischen Enzymen. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen war der Angriff weitgehend auf die kurzen, nichthelikalen Bereiche an den Enden beschränkt, so daß die tripelhelikale Konformation der Moleküle gewahrt blieb. Da im Elektronenmikroskop beim nativ gelösten Kollagen fast ausschließlich Verknüpfungen über terminale Bereiche (über jeweils gleiche Enden, "end-to-end"-Typ) beobachtet wurden, war beim Abbau mit einer Abspaltung entsprechender Quervernetzungspeptide zu rechnen. So wurde durch Pronase und Chymotrypsin der größte Teil der mehrkettigen Komponenten in Einzelketten umgewandelt, mit Pepsin wurde nur ein unbedeutender Effekt erzielt.

Eine Unterscheidung zwischen Quervernetzungen über die Amino-oder Carboxylenden erlaubte der limitierte Bromcyanabbau (15°). Der Ablauf war analog der Enzymbehandlung, nur wurden dabei (bedingt durch die Position der Methioninreste in der α 1-und α 2-Kette) spezifisch N-terminale Bereiche abgespalten. Es konnte so beispielsweise gezeigt werden, daß im Citratextrakt, der im

Durchschnitt etwa zur Hälfte aus β -Komponenten besteht, Verknüpfungen hauptsächlich über N-terminale Peptide zustandekommen. Der Anteil der durch limitierten Bromcyanabbau nicht gespaltenen Quervernetzungs-komponenten, die somit nicht über N-terminale Bereiche verbunden sein dürften, war demgegenüber größer in Extrakten (Essig-, Milchsäure) mit höherem Gehalt an Polymeren.

Klarheit in die Verhältnisse am Aminoende brachte die genauere Charakterisierung der N-terminalen Bromcyan-peptide aus α_2 und β -Komponenten sowie die Sequenzbestimmung dieses Bereichs.

In der α_2 -Kette bildet α_2 -CB1 das N-terminale Ende. Das 12 Aminosäuren umfassende Peptid unterscheidet sich in seiner Aminosäurezusammensetzung von α_2 -CB1 aus Ratte (14 Reste) und Huhn (15 Reste) vor allem durch das Fehlen von Tyrosin und Serin, dagegen scheint im α_2 -CB1 des Kaninchens lediglich ein Alanin gegen Glycin ausgetauscht zu sein. Aus Präparationen von nativ und harnstoffgelöstem Kollagen wurden identische Peptide gewonnen.

Die Sequenzanalyse des N-terminalen Bereichs umfaßte das Peptid α_2 -CB1, das Tripeptid α_2 -CB0 und einige Tripletts im α_2 -CB4. Das Resultat macht deutlich, daß sich die Speziesunterschiede (verglichen mit Huhn und Ratte) auf die ersten sieben Reste beschränken. Begrenzt variabel, in α_2 (Kalb) Rest 5, ist die Position des für die Quervernetzung essentiellen Lysins. Mit dem Übergang zur Helix werden Austausch sehr selten, auch gegenüber der α_1 -Kette ist in diesem Abschnitt eine weitgehende Homologie festzustellen.

Da in vorangegangenen Experimenten α_2 -CB3,5 als einzig mögliches C-terminales Peptid erkannt worden war, be-

stätigte die durchgeführte Sequenzanalyse außerdem die Reihenfolge der α 2-Bromcyanpeptide: 1-0-4-2-3,5. Hiervon unabhängig ergab sich die Position des α 2-CB2 auch aus der Untersuchung der α 2-Kollagenasepeptide (siehe dort).

Die N-terminalen Quervernetzungspeptide β 11-CB(0,1x0,1) und β 12-CB(0,1x1) wurden durch Bromcyanspaltung (30°) der β 11-bzw. β 12-Komponente dargestellt. In Molekulargewicht und Aminosäureanalyse stimmten beide mit der Summe der jeweils beteiligten Einzelpeptide überein. In den Vorstufen zu diesen (über ein Aldol verknüpften) Verbindungen, den Peptiden α 1-CB0,1^a und α 2-CB1^a, sind die Lysinseitenreste zum Aldehyd oxidiert. Da nunmehr die Anfangssequenz beider Ketten vorlag, war geklärt, daß die kovalente Verknüpfung in α 1 von Rest 9 und in α 2 von Rest 5 ausgeht. Über diese Reste werden dem elektronenmikroskopischen Bild zufolge neben den intramolekularen Quervernetzungen (Verknüpfung der Ketten innerhalb eines Moleküls) auch intermolekulare (Ver-netzung verschiedener Moleküle) gebildet.

Nicht so eindeutige Aussagen konnten über C-terminale Quervernetzungspeptide gemacht werden. Derartige Komponenten wurden in geringerem Maße gefunden, außerdem war es den Experimenten nach zu urteilen wahrscheinlich, daß sie an intermolekularen Quervernetzungen höherer Polymerer beteiligt sind. Auf der Ebene der Bromcyan-peptide ergaben sich die Kombinationsmöglichkeiten zwischen den C-terminalen Peptiden α 1-CB6 und α 2-CB3,5. Isoliert wurden zwei Komponenten, A und B, die nach den angewandten Kriterien (chromatographisches Verhalten, Molekulargewicht, Aminosäurezusammensetzung) identisch mit den Peptiden β 22-CB(3,5x3,5) und β 12-CB(6x3,5) sein

sollten. Die letztere Komponente konnte zwar nicht in völlig reiner Form gewonnen werden, doch sprach für ihre Identität zusätzlich ein immunologischer Test auf die Determinanten in $\alpha 1$ -CB6 und $\alpha 2$ -CB3,5. Die Isolierung von Quervernetzungs-komponenten durch Nachspaltung derjenigen β -Komponenten mit Bromcyan (30°), die nach selektiver Abspaltung der N-terminalen Quervernetzungs-peptide erhalten wurden, gelang nicht. Offensichtlich lag das daran, daß ein Teil der Methioninreste verändert (vermutlich oxidiert) war und daher nicht mehr reagierte.

Für die Sequenzaufklärung des helikalen Teils der $\alpha 2$ -Kette war es nötig, Kettenbruchstücke herzustellen. Die Verteilung der Methioninreste war hinsichtlich der Bromcyanspaltung in der $\alpha 2$ -Kette weitaus ungünstiger als in $\alpha 1$. Man erhält (beim Kalb) drei kurze Peptide $\alpha 2$ -CB1, $\alpha 2$ -CB0 und $\alpha 2$ -CB2 mit 12, 3 und 30 Aminosäuren und die beiden großen $\alpha 2$ -CB4 mit 321 und $\alpha 2$ -CB3,5 (in anderen Spezies $\alpha 2$ -CB3 und $\alpha 2$ -CB5) mit etwa 660 Aminosäuren. Daher bot sich als gute Ergänzung die limitierte Spaltung am nativen Molekül mit Bakterienkollagenase an. Charakteristisch für diesen Abbau ist, daß native Molekülfragmente von zwar unterschiedlicher Größe entstehen, die aber am Carboxylende praktisch um den gleichen Abschnitt im Molekül verkürzt sind. Ihre Länge und Position im Molekül war bei früheren Versuchen im Elektronenmikroskop festgestellt worden. Die sechs Fragmente aus Kalbshaut-SLK wurden durch Ammoniumsulfatfällung grob (nach Molekulargewicht) vorfraktioniert. Nach Denaturierung wurden die einzelnen $\alpha 2$ -Bruchstücke chromatographisch abgetrennt. Die Aufgabe bei der weiteren Untersuchung war, Peptide für die direkte Sequenzierung oder anschließende enzymatische Fragmentierung herzu-

stellen, nähere Informationen über die Verteilung der Aminosäuren in der α 2-Kette zu geben und damit unter anderem die Zuordnung kürzerer Peptide zu erleichtern.

Die Peptide α 2(78), α 2(105) und α 2(125) umfassen einen Teil des C-terminalen Peptids α 2-CB3,5. Im Gegensatz zu Ratte, wo die Peptide α 2-CB3 und α 2-CB5 auftreten, konnte in diesen Bruchstücken kein Methionin festgestellt werden. Ungewöhnlich ist - im Bereich von α 2(78) - das Vorkommen eines Tyrosins im helikalen Teil. Bei den längeren Peptiden α 2(190), α 2(220) und α 2(260) ermöglichen die beiden Methioninreste eine weitere Aufspaltung mit Bromcyan. Von den entstehenden Bruchstücken sind nur die N-terminalen unterschiedlich, die Homoserin-peptide α 2(190)-CBN, α 2(220)-CBN und α 2(260)-CBN repräsentieren überlappende Abschnitte von α 2-CB4. Das C-terminale Peptid α 2(190)-CBC stellt ein um 85-90 Aminosäuren verkürztes α 2-CB3,5 dar. Für das intakt gebliebene α 2-CB2 ergibt sich hieraus die Position in der Kette zwischen α 2-CB4 und α 2-CB3,5.

Die Aufgliederung der Kette in überschaubare Einheiten (Abb. 29, Tabelle 10) gestattet gewisse Voraussagen über die zu erwartenden Peptide nach Enzymspaltung. Beispielsweise ist im ersten Viertel von α 2-CB3,5 mit einer größeren Zahl chymotryptischer Peptide zu rechnen, da dort je fünf Reste Phenylalanin und Leucin vorkommen. Eine wertvolle Hilfe für die Zuordnung kleinerer Bruchstücke kann ferner die ungleichmäßige Verteilung von seltener vorkommenden Aminosäuren bedeuten, wie Tyrosin, Hydroxylysin und Histidin. So ist die Hälfte der Histidinreste auf das C-terminale Stück konzentriert, das durch Kollagenase abgespalten wird, lediglich in α 2-CB4 und im α 2(78)-Bereich sind jeweils zwei weitere Reste ent-

halten. Beim Hydroxylysingehalt läßt sich eine Zunahme zu beiden Enden hin feststellen.

Für die automatisierte Sequenzanalyse schafft die Bildung neuer aminoendständiger Bereiche mit größeren Überlappungen günstige Voraussetzungen. Dies trifft für $\alpha 2\text{-CB}_4$, das dadurch in vier Abschnitte unterteilt wird, und den mittleren Teil von $\alpha 2\text{-CB}_{3,5}$ zu. Von der Größe her gesehen sollten vor allem die Bruchstücke in $\alpha 2\text{-CB}_4$ zur direkten Sequenzierung gut geeignet sein.

4. EXPERIMENTELLER TEIL

Kollagenpräparation:

Der Mittelspalt frischer Kalbshaut (1-2kg) wurde mit etwa gleichen Teilen Eis im Fleischwolf zerkleinert und mehrmals mit Eiswasser gewaschen. Falls nicht anders angegeben, wurden alle Arbeiten bei 4°C durchgeführt, die Zentrifugation erfolgte bei 20000g, allen Lösungen wurde 0,01% EDTA zugesetzt.

Neutralsalz- und säurelösliches Kollagen (nativ) [69,17]:

Zur Herstellung neutralsalzlöslichen Kollagens, NLK, wurde 48 Stunden unter ständigem Rühren mit dem 10-fachen Volumen einer 1m NaCl-Lösung (0,05m Tris pH 7,5) extrahiert. Das NLK im Überstand wurde durch Zugabe von NaCl auf etwa 20% (Gew/Vol) gefällt, das Präzipitat abzentrifugiert (halbe Stunde), mit 20% NaCl-Lösung gewaschen und in 0,5m Essigsäure wieder gelöst. Die saure Lösung wurde eine Stunde zentrifugiert und das NLK nochmals durch NaCl-Zusatz auf etwa 5% ausgefällt. Das abzentrifugierte Präzipitat wurde in 0,05m Essigsäure gelöst und die Lösung etwa vier Tage bei 4°C gegen 0,05m Essigsäure dialysiert. Der Rückstand der ersten Extraktion wurde noch zweimal in gleicher Weise behandelt.

Bei der Präparation des säurelöslichen Kollagens, SLK, wurde jeder Extraktionsschritt einmal wiederholt. Zur Herstellung des Citratextrakts wurde der in Neutralsalz unlösliche Rückstand mit destilliertem Wasser gewaschen und zwei Tage bei pH 3,7 der Extraktion mit dem zehnfachen Volumen an 0,5m Citratpuffer (10,5g Citronensäure (H₂O) krist., 50ml 1n HCl, 100ml 1n NaOH auf 1000ml) unterworfen. Das

citratlösliche Kollagen in den klar zentrifugierten Überständen wurde durch Zugabe von NaCl auf 5% gefällt und wie NLK gereinigt. Der in Citratpuffer nicht lösliche, mit Wasser gewaschene Rückstand wurde mit dem zwanzigfachen Volumen 0,5%-iger Essigsäure zwei Tage extrahiert und der Essigsäureextrakt der gleichen Prozedur wie Citratextrakt unterzogen. Abschließend wurde noch zweimal in 0,25m Milchsäure (zehnfaches Volumen) jeweils zwei Tage extrahiert. Nach zweistündiger Zentrifugation wurden die Kollagenlösungen wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Denaturierende Extraktion mit 8m Harnstofflösung [45]:

Das wie bei NLK zerkleinerte Rohmaterial wurde eine halbe Stunde bei 4°C mit 8m Harnstofflösung gewaschen. Der abzentrifugierte Überstand wurde verworfen und der Rückstand mit dem zehnfachen Volumen 8m Harnstofflösung bei Raumtemperatur (20-25°C) extrahiert. Nach einer Stunde wurde abzentrifugiert und der Rückstand abermals mit 8m Harnstofflösung versetzt. Anschließend wurden weitere Extrakte nach einer, drei und neun Stunden gewonnen. Die Kollagenlösungen wurden bei Raumtemperatur eine halbe Stunde bei 20000g zentrifugiert und ein zweites Mal nach viertägiger Dialyse gegen 0,1m Essigsäure. Der letzte Extrakt wurde wegen seiner hohen Viskosität vor dem Zentrifugieren 1:1 verdünnt.

Enzymabbau am nativen Kollagen.

Chymotrypsin

Native essigsäure Kollagenlösung (Citratextrakt, eingestellt auf etwa 1mg/ml) wurde bei 4°C zunächst gegen 1m CaCl₂-Puf-

fer (pH 7,5) dialysiert. Durch die hohe CaCl_2 -Konzentration blieb das Protein beim Neutralisieren in Lösung. Die Dialyse wurde drei Tage gegen 0,1m CaCl_2 Pufferlösung (0,05m Tris HCl, pH 7,5) fortgesetzt (Abbau modifiziert nach Bornstein bzw. Stark et al. [50,51]). α -Chymotrypsin (Worthington) gelöst im gleichen Puffer wurde im Verhältnis Enzym: Substrat 1:30 zugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation bei 20°C wurde der Abbau durch Ansäuern mit Essigsäure auf etwa pH 4 beendet und auf 4°C abgekühlt.

Die Lösung wurde erst gegen verdünnte Essigsäure und dann gegen 15%-igen KCl-Puffer (0,356% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (2\text{H}_2\text{O})$, pH 7,2) dialysiert, das ausgefällte Protein abzentrifugiert und zur Inaktivierung restlichen Enzyms in 8m Harnstoff gelöst. Für die anschließende CM-Cellulosetrennung wurde gegen Startpuffer pH 4,8 dialysiert oder im gleichen Puffer an Bio-Gel P-2 (100-200 mesh) entsalzt.

Pronase:

Abbau und Weiterverarbeitung der Probenlösung wurden wie bei Chymotrypsin durchgeführt [25]. Die Inkubationszeit mit Pronase (Serva) betrug 25 Stunden bei einem Enzym: Substrat-Verhältnis 1:10.

Pepsin:

Die Lösung wurde bei 4°C mit HCl auf pH 2 eingestellt [25]. Nach Zugabe des Pepsins (Serva) im Enzym:Substrat-Verhältnis 1:100 wurde 18 Stunden bei 20°C inkubiert. Die Reaktion wurde wie oben beschrieben durch Dialyse, Umfällen und Enzyminaktivierung in Harnstoff beendet.

Bromcyanspaltung

1. Spaltung an nativem Kollagen.

Lösungen nativen Kollagens (1-4mg/ml) wurden nach Bornstein et al. [50] unter ständigem Rühren bei 4°C mit 1n HCl tropfenweise auf pH 1 eingestellt und anschließend mit Stickstoff gesättigt. Nach Lösen des etwa hundertfach-molaren Überschusses an Bromcyan (Schuchardt München, durch Sublimation gereinigt) bezogen auf den Methioningehalt, wurde 14 bis 120 Stunden bei 15°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde nach Abkühlen des Ansatzes das Reagenz durch Evakuieren an der Wasserstrahlpumpe und anschließende Dialyse oder durch Gefriertrocknen entfernt.

2. Bromcyanspaltung von denaturiertem Kollagen.

Bis zu 10mg Protein pro ml Lösung wurden nach Bornstein und Piez [31] eine halbe Stunde bei 40°C denaturiert und nach Abkühlen auf 20°C mit 1n HCl unter Rühren auf pH 1 eingestellt. Der Ansatz wurde mit Stickstoff gesättigt, ein hundertfach-molarer Bromcyanüberschuss (bezogen auf die Methioninreste) zugegeben und vier Stunden bei 30°C abgebaut. Anschließend wurde das Bromcyan durch Gefriertrocknen oder Trennung an Bio-Gel P-2 entfernt.

Enzymabbau von $\alpha 2$ -CB1

Trypsin

Die Probe wurde wie bei Rauterberg et al. [45] beschrieben in 0,2m NH_4HCO_3 Puffer (0,001m CaCl₂ pH 7,8) gelöst, TPCK be-

handeltes Trypsin (2xkrist., Worthington) im Verhältnis Enzym:Substrat 1:50 zugesetzt und vier Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde gekühlt, mit Eisessig auf etwa pH 4 eingestellt und lyophilisiert, bzw. direkt an Bio-Gel P-2 (200-400mesh) getrennt.

Chymotrypsin:

Die Bedingungen beim Abbau mit α -Chymotrypsin (Worthington) waren die gleichen wie bei Trypsin, nur betrug die Inkubationszeit 40 Minuten [51].

Darstellung nativer Molekülfragmente durch Kollagenaseabbau

a) Abbau

Citratlösliches Kollagen wurde gegen 10% KCl-Lösung gefällt, in 0,04M CaCl_2 -Puffer (0,05M Tris-HCl, pH 7,0) gelöst und wie bei Stark und Kühn beschrieben [67] mit Rohkollagenase aus *Clostridium histolyticum* (Worthington) bei 10°C abgebaut. Die Proteinkonzentration wurde auf 2mg/ml eingestellt und Kollagenase im Verhältnis Enzym: Substrat wie 1:10 zugegeben. Während der Reaktion wurde die Änderung der optischen Drehung verfolgt. Nachdem die spezifische Drehung ($[\alpha]_{405}$) von -1000° auf -500° gesunken war (ca. 24 Stunden), wurde der Abbau durch Einstellen auf pH 2,5 mit Essigsäure gestoppt und der Ansatz gegen 0,1M Essigsäure dialysiert.

b) Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung:

Die Lösung der Molekülfragmente wurde bei 4°C unter ständigem Rühren mit kaltgesättigter Ammoniumsulfatlösung bis zu einer Salzkonzentration von 19% bei der ersten und 26% bei der zweiten Fällung versetzt. Nach Erreichen der

jeweiligen Konzentration wurde noch zwölf Stunden gerührt und das ausgefällte Protein anschließend bei 20000g abzentrifugiert. Die beiden erhaltenen Fraktionen wurden in 0,5%-iger Essigsäure gelöst und für die Auftrennung an CM-Cellulose gegen Startpuffer pH 4,8 dialysiert.

Ionenaustauscherchromatographie

1. CM-Cellulose:

Die Trennung von $\alpha 1, \alpha 2, \beta 11$ und $\beta 12$ erfolgte nach Piez et al. [1] an CM-Cellulose (CM 52 Mikrogranular 1,0meg/g, Whatman) in auf 40°C thermostatisierten Säulen. Bei präparativen Trennungen betrug die Füllhöhe etwa 15cm bei einem Durchmesser von 2,5cm. Für Vorversuche und Trennungen bis zu 20mg wurden die Dimensionen 1,7x7-8cm gewählt. Die Trennung wurde bei pH 4,8 in 0,06m Natriumacetatpuffer (8, 16g Natriumacetat ($3H_2O$), 12,9ml Essigsäure auf 1000ml) mit einem linearen Gradienten (0-0,1m NaCl) aufsteigend durchgeführt. Das Gesamtvolumen des Gradienten für die großen Säulen war 800-1000ml bei Durchflüssen von 150-200ml/h, für die kleinen Säulen 200-500ml bei 90-120ml/h.

Die Trennung der Kollagenasebruchstücke erfolgte bei einer Anfangskonzentration niedrigerer Ionenstärke (0,05m Natriumacetat, pH 4,8, Gradient 0-0,095m NaCl), die Rechromatographie wurde nach den oben genannten Angaben vorgenommen.

2. Phosphocellulose:

Phosphocellulose (Flockform, Whatman) wurde für Peptidtrennungen verwendet. Es wurde bei pH 3,8 in 0,001m

Natriumacetatpuffer (1:100-Konzentrat:13,6g Natriumacetat ($3H_2O$), 57,2ml Essigsäure auf 1000ml) mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-0,3 oder 0-0,6m NaCl) bei $40^{\circ}C$ aufsteigend chromatographiert. Die Trennungen wurden an Säulen 1,7x6cm und 2,5x10cm durchgeführt bei Durchflüssen um 100 bzw. 180ml/h entsprechend der Säulengröße und mit Gesamtvolumina der Gradienten von 200ml bis zu 1000ml.

Molekularsiebchromatographie

1. Bio-Gel A (Sphärische Agarose Gele, Fa. Bio-Rad):

Bio-Gel A-1,5 (200-400mesh)

Eluiert wurde bei pH 7,5 und Raumtemperatur in 1m $CaCl_2$, Tris-HCl Puffer (267g $CaCl_2 (2H_2O)$, 30,3g Tris, 25% HCl pH 7,5/1000ml). Im angegebenen Puffer bleibt Kollagen bei $20^{\circ}C$ denaturiert. Die Säulenabmessungen waren 1,5x118cm und 3x144cm bei Durchflüssen von etwa 12 bzw. 40-45ml/h.

Bio-Gel A-15 (200-400mesh)

Es wurde der gleiche Puffer wie bei Agarose A-1,5 verwendet. Die Säule hatte die Maße 1,5x118cm, eluiert wurde mit 12ml/h.

Bio-Gel P (Sphärische Polyacrylamid Gele, Fa. Bio-Rad):

Bio-Gel P-10 (200-400mesh)

Getrennt wurde in 0,03m Natriumacetatpuffer (Essigsäure pH 4,8)

bei 20-25°C. Der Durchfluß betrug bei den Säulenabmessungen von 1,5x118cm 12ml/h.

Bio-Gel P-4 (200-400 mesh)

Getrennt wurde in 0,1m Essigsäure bei 20-25°C. Die Durchflußgeschwindigkeit an der 4x145cm-Säule war 80-90ml/h.

Bio-Gel P-2 (200-400mesh)

Die Trennbedingungen waren die gleichen wie an Bio-Gel P-4. An der 3,8x45,5cm-Säule betrug der Durchfluß 25ml/h, bei 1,5x116cm 12ml/h.

Sephadex G-50 superfine (Fa. Pharmacia)

Das Peptidgemisch wurde an einer thermostatisierten 2x140cm-Säule bei 37°C getrennt. Eluiert wurde mit dem gleichen Puffer wie an Bio-Gel P-10 bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 21ml/h.

Entsalzung

Kollagenlösungen in nativem Zustand wurden bei 4°C gegen 0,1m Essigsäure dialysiert. Peptide wurden an Bio-Gel P-2 (100-200 mesh) in 0,1m Essigsäure entsalzt. Die entsalzten Proben wurden im Vakuumverdampfer eingeeengt oder gefriergetrocknet. Denaturierte Ketten und größere Bruchstücke (Molekulargewicht über 30000) konnten wahlweise durch Dialyse oder Gelchromatographie von Salzen getrennt werden.

Messung der Lichtabsorption

Alle Eluate wurden kontinuierlich in einem DB-Spektral-photometer der Fa. Beckman/München gemessen.

Gehaltsbestimmung anhand der spezifischen optischen Drehung

Die Messung wurde mit einem photoelektrischen Präzisions-photometer der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen durchgeführt (10cm Rohr). $[\alpha]_{405}$ für natives Kollagen beträgt -1000° , für denaturiertes -360° . Die gemessenen Proteinkonzentrationen lagen im Bereich von 0,2 bis 5mg/ml.

Reisfeld-Diskelektrophorese

Die Diskelektrophorese nach Reisfeld [49] wurde mit einer Polyacrylamidkonzentration von 2,5% im oberen Gel und 5% oder 7,5% im unteren Gel durchgeführt. Der Kammerpuffer wurde auf pH 4,8 eingestellt (31,2g β -Alanin, 2ml Essigsäure auf 1000ml). Von den mit Harnstoff gesättigten Probenlösungen wurden 20 bis 250 μ l aufgetragen entsprechend einer Proteinmenge von etwa 10-50 μ g. Die Trennung erfolgte bei einer Stromstärke von 4mA pro Gelröhrchen (Laufrichtung zur Kathode). Angefärbt und fixiert wurde 25 Minuten mit 1%-iger Amidoschwarz-B-lösung (7,5% Essigsäure), entfärbt etwa 24 Stunden in 7% Essigsäure.

SDS-Diskelektrophorese

Für die Trennung der Bromcyanpeptide an SDS-Diskelektrophorese wurde 5%-iges Gel verwendet [70,60]. Der Kammerpuffer enthielt 0,1m Phosphat und 0,1% SDS, bei einem pH-Wert von 7,2. Zum Probenauftrag wurden 20-40 μ g Protein-

gemisch in 20 μ l 0,01m Phosphatpuffer pH 7,2 (0,2% SDS, 2m Harnstoff) gelöst. Getrennt wurde bei 6mA pro Gelröhrchen (Laufrichtung zur Anode). Anfärbung und Fixierung erfolgte mit 0,2% Coomassie Brilliant Blue, 20% Trichloressigsäure. Nach zwei Stunden Färbebad wurde etwa zwanzig Stunden in 7%-iger Essigsäure entfärbt.

Elektronenmikroskopische Untersuchung

Die Lösungen wurden bei 4°C gegen 0,1%-ige Essigsäure dialysiert und die sog. SLS (segments long spacing) durch Dialyse gegen 0,4% ATP-Lösung (ATP- Na_2 Salz, krist., Fa. Serva, Heidelberg) gefällt. Die Segmentsuspension wurde auf einen Kolodium-Kohlefilm gebracht, bei pH 3,5 mit Phosphorwolframsäure gefärbt und mit Uranylacetat nachkontrastiert.

Die Aufnahmen wurden am Elmiskop 1a (Siemens und Halske, Berlin) bei einer Strahlspannung von 80KV ausgeführt.

Molekulargewichtsbestimmung

Die Messungen erfolgten an SDS-Diskelektrophorese oder Molekularsieb: an den Säulen Bio-Gel A-1,5, Bio-Gel P-10, Sephadex G-50s gemäß den jeweils angegebenen Trennbedingungen. Zur Aufstellung der Eichkurven wurden Kalibrierungsläufe mit bekannten Kollagenpeptiden bzw. Ketten durchgeführt.

Aminosäureanalyse

Die Analysen wurden im Einsäulenverfahren (Spackman, Stein und Moore [71]) an den automatischen Aminosäureanalysatoren Biochrom BC 200 (Bio-Cal, München) und Multichrom (Beckman, München) durchgeführt. Zur besseren Reproduzierbarkeit der Methioninwerte enthielten sämtliche Elutionspuffer 0,5% Thiodiglykol. Je nach Molekülgröße wurde bis zu 0,5mg (bei etwa 1000 Aminosäuren) in 1ml konstant siedender HCl (etwa 6n) 24 Stunden unter Stickstoff bei 110°C hydrolysiert. Nach Keutmann und Potts [64] wurde bei der Hydrolyse 2-Mercaptoäthanol (1:2000) zugesetzt, um eine teilweise Oxidation des Methionins während der Hydrolyse zu verhindern. HCl wurde im Vakuum entfernt und sofern Homoserin bestimmt werden sollte, eine Stunde bei 37°C mit 1ml 0,1m Piperidinlösung inkubiert und nochmals getrocknet. Zur Bestimmung der Hydrolyseverluste bei Serin und Threonin wurden einige Proben 12, 24, 40 und 70 Stunden hydrolysiert.

Soweit nicht anders vermerkt, wurde zur Berechnung der Aminosäurereste pro Peptid die Molekülgröße nach der Molekulargewichtsbestimmung herangezogen. Bei kleineren Peptiden wurde weitgehend ein ganzzahliges Verhältnis der einzelnen Reste angestrebt, hierbei wurden primär Aminosäuren berücksichtigt, die am Analysator gut bestimmbar sind und praktisch keine Hydrolyseverluste erleiden.

Sequenzierung

Die automatisierte Sequenzanalyse nach Edman und Begg [72] wurde am "Protein-Peptide Sequenzer" (Beckman Instruments, Palo Alto, Californien) durchgeführt. Es wurde das "double

cleavage"-Quadrolprogramm benutzt. Die Umwandlung der abgespaltenen Anilinothiazolinon-Derivate in die PTH-Aminosäuren erfolgte in 1n HCl 10 Minuten bei 80°C. Die PTH-Aminosäuren wurden an Dünnschichtplatten [73] (Kieselgel F 254, 20x20, Merck Darmstadt) oder im Gaschromatographen [74] GC-45 (Beckman Instruments, Palo Alto, Californien) identifiziert.

Bei der Sequenzierung der $\alpha 2^P$ -Kette wurden in zwei Läufen je 10mg Protein eingesetzt, was ungefähr 100 nMol entspricht.

5. LITERATUR

1. Piez, K.A., Eigner, E.A., Lewis, M.S.
Biochemistry 2 (1963), 58
2. Rich, A., Crick, F.H.
J. Mol. Biol. 3(1961), 483
3. Traub, W., Yonath, A., Segal, D.M.
Nature 221(1969), 914
4. Bellamy, G., Bornstein, P.
Proc. Natl. Acad. Sci. 68(1971), 1138
5. Bornstein, P., von der Mark, K., Wyke, A.W., Ehrlich, H.P., Monson, J.M.
J. Biol. Chem. 247(1972), 2808
6. Smith, B.D., Byers, P.H., Martin, G.R.
Proc. Natl. Acad. Sci. 69(1972), 3260
7. Dehm, P., Jimenez, S.A., Olsen, B.R., Prockop, D.J.
Proc. Natl. Acad. Sci. 69(1972), 60
8. Burgeson, R.E., Wyke, A.W., Fessler, J.H.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 48(1972), 892
9. Kühn, K., Hofmann, U., Graßmann, W.
Naturwiss. 47(1960), 258
10. Kühn, K., Zimmer, E.
Z. Naturforschg. 16b(1961), 648
11. Hulmes, D.J.S., Miller, A., Parry, D.A.D., Piez, K.A.,
Woodhead-Galloway, J.
im Druck
12. Pinnell, S.R., Martin, G.R.
Proc. Natl. Acad. Sci. 61(1968), 708
13. Schiffmann, E., Martin, G.R.
Arch. Biochem. Biophys. 138(1970), 226
14. Tanzer, M.L.
Biochim. Biophys. Acta 133(1967), 584
15. Bailey, A.J.
Biochim. Biophys. Acta 160(1968), 447
16. Bailey, A.J., Fowler, L.J., Peach, C.M.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 35(1969), 663
17. Bornstein, P., Piez, K.A.
Biochemistry 5(1966), 3460
18. Piez, K.A., Miller, E.J., Lane, J.M., Butler, W.T.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37(1969), 801

19. Rojkind, M., Gutiérrez, A.M.
Arch. Biochem. Biophys. 131(1969), 116
20. Ayad, S., Wynn, C.H.
Biochem. J. 118(1970), 61
21. Franzblau, C., Kang, A.H., Faris, B.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40(1970), 437
22. Kang, A.H.
Biochemistry 11(1972), 1828
23. Traub, W., Piez, K.A.
Adv. Prot. Chem. 25(1971), 243
24. Gallop, P.M., Blumenfeld, O.O., Seifter, S.
Ann. Rev. Biochem. 41(1972), 617
25. Kühn, K., Fietzek, P.P., Kühn, J.
Biochem. Z. 344(1966), 418
26. Zimmermann, B.K., Pikkariainen, J., Fietzek, P.P., Kühn, K.
Eur. J. Biochem. 16(1970), 217
27. Petruska, J.A., Hodge, A.J.
Proc. Natl. Acad. Sci. 51(1964), 871
28. Hodge, A.J., Highberger, J.H., Deffner, G.G.J., Schmitt, F.O.
Proc. Natl. Acad. Sci. 46(1960), 197
29. Rubin, A.L., Drake, M.P., Davison, P.F., Pfahl, D., Speakman, P.T.,
Schmitt, F.O.
Biochemistry 4(1965), 181
30. Gross, E., Witkop, B.
J. Am. Chem. Soc. 83(1961), 510
31. Bornstein, P., Piez, K.A.
Science 148(1965), 1353
32. Bornstein, P., Kang, A.H., Piez, K.A.
Proc. Natl. Acad. Sci. 55(1966), 417
33. Butler, W.T., Piez, K.A., Bornstein, P.
Biochemistry 6(1967), 3771
34. Fietzek, P.P., Piez, K.A.
Biochemistry 8(1969), 2129
35. Vuust, J., Lane, J.M., Fietzek, P.P., Miller, E.J., Piez, K.A.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38(1970), 703
36. Kang, A.H., Bornstein, P., Piez, K.A.
Biochemistry 6(1967), 788
37. Bornstein, P.
Biochemistry 6(1967), 3082

38. Butler, W.T.
Biochemistry 9(1970), 44
39. Butler, W.T., Ponds, S.L.
Biochemistry 10(1971), 2076
40. Rauterberg, J., Kühn, K.
Eur. J. Biochem. 19(1971), 398
41. Fietzek, P.P., Wendt, P., Kell, I., Kühn, K.
FEBS Letters 26(1972), 74
42. Fietzek, P.P., Rexrodt, F.W., Hopper, K., Kühn, K.
Eur. J. Biochem. (1973), im Druck
43. Wendt, P., von der Mark, K., Rexrodt, F.W., Kühn, K.
Eur. J. Biochem. 30(1972), 169
44. Fietzek, P.P., Rexrodt, F.W., Wendt, P., Stark, M., Kühn, K.
Eur. J. Biochem. 30(1972), 163
45. Rauterberg, J., Fietzek, P.P., Rexrodt, F.W., Becker, U., Stark, M.,
Kühn, K.
FEBS Letters 21(1972), 75
46. Rauterberg, J., Timpl, R., Furthmayr, H.
Eur. J. Biochem. 27(1972), 231
47. Balian, G., Click, E.M., Hermodson, M.A., Bornstein, P.
Biochemistry 11(1972), 3798
48. Fietzek, P.P., Münch, M., Breitzkreutz, D., Kühn, K.
FEBS Letters 9(1970), 229
49. Reisfeld, R.A., Lewis, U.J., Williams, D.E.
Nature 195(1962), 281
50. Bornstein, P., Kang, A.H., Piez, K.A.
Biochemistry 5(1966), 3803
51. Stark, M., Rauterberg, J., Kühn, K.
FEBS Letters 13(1971), 101
52. Fietzek, P.P., Hadjiargyriou, E.
in Vorbereitung
53. Highberger, J.H., Kang, A.H., Gross, J.
Biochemistry 10(1971), 610
54. Fietzek, P.P., Kell, I., Kühn, K.
FEBS Letters 26(1972), 66
55. Fietzek, P.P.
unveröffentlichte Ergebnisse
56. Kang, A., Gross, J.
Biochemistry 9(1970), 796

57. Kang,A., Bornstein,P., Piez,K.A.
Biochemistry 6(1967), 788
58. Bornstein,P., Nesse,R.
Arch. Biochem. Biophys. 138(1970), 443
59. Piez,K.A.
Anal. Biochem. 26(1968), 305
60. Furthmayr,H., Timpl,R.
Anal. Biochem. 41(1971), 510
61. Pontz,B., Meigel,W., Rauterberg,J., Kühn,K.
Eur. J. Biochem. 16(1970), 50
62. Becker,U.
Dissertation, München 1972
63. Tanzer,M.L., Housley,T., Berube,L., Fairweather,R., Franzblau,C.,
Gallop,P.M.
J. Biol. Chem. 248(1972), 393
64. Keutmann,H.T., Potts,J.T.
Anal. Biochem. 29(1969), 175
65. Miller,E.J.
Biochemistry 26(1972), 4903
66. Miller,E.J., Woodall,D.L., Vail,M.S.
in Vorbereitung
67. Stark,M., Kühn,K.
Eur. J. Biochem. 6(1968), 534
68. von der Mark,K., Rexrodt,F.W., Wendt,P., Kühn,K.
Eur. J. Biochem. 16(1970), 143
69. Kühn,K., Schuppler,G., Kühn,J.
Hoppe Seyler's Z. phys. Chem. 338(1966), 10
70. Shapiro,A.L., Vinnela,E., v.Maizel,J.V.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28(1967), 815
71. Spackmann,D.M., Stein,W.H., Moore,S.
Anal. Chem. 30(1958), 1190
72. Edman,P., Begg,G.
Eur. J. Biochem. 1(1967), 80
73. Edman,P.
in: Protein Sequence Determination (Her.-gb. Needleman, S.B.)
S.211, Springer 1970: Berlin-Heidelberg-New York
74. Pisano,J.J., Bronzert,T.J.
J. Biol. Chem. 244(1969), 5597

LEBENS LAUF

Am 6.2.1942 wurde ich als Sohn des Apothekers Rolf Breitzkreutz und seiner Ehefrau Eugenie, geborene Bergmann, in Waidhofen (Österreich) geboren. In Hof/Saale besuchte ich die Grundschule und das humanistische Gymnasium bis zum Abitur 1962.

Nach zweijähriger Praktikantenzeit in der Hofapotheke in Coburg studierte ich in Würzburg Pharmazie und legte dort 1967 die Pharmazeutische Prüfung ab.

Das anschließende Studium der Lebensmittelchemie an der Universität München schloß ich 1969 mit der Staatsprüfung ab. Seit September 1969 arbeite ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Klaus Kühn am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung an der vorliegenden Dissertation.

Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit.

